

**UNTERSUCHUNGEN
ZU EINEM HETEROZYGOTENTEST FÜR DAS
KONGENITALE ADRENOGENITALE SYNDROM**

Wolfgang Wagner

1975

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus B e t k e

UNTERSUCHUNGEN ZU EINEM HETEROZYGOTENTEST FÜR DAS
KONGENITALE ADRENOGENITALE SYNDROM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang W a g n e r
aus
Hohenpeißenberg

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dietrich Knorr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Betke

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.10.1975



Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen
Ringens sorgt unablässig dafür, daß dem
forschenden Menschegeist seine beiden
edelsten Antriebe erhalten bleiben und
immer wieder von neuem angefacht werden:
Die Begeisterung und die Ehrfurcht.

Max Planck

Meinen Eltern

V o r w o r t

Die vorliegende Arbeit entstand in dreijähriger Tätigkeit an der Endokrinologischen Abteilung der Kinderklinik der Universität München. Erste Ergebnisse konnte Herr Prof. Dr. med. D. Knorr am 14.9.1974 in Paris der European Society For Paediatric Endocrinology vortragen. Ein Abstract dieses Vortrages wird unter dem Titel "A Test For Heterocycosity In Congenital Adrenal Hyperplasie (CAH)" in Pediatric Research veröffentlicht.

Im Anschluß daran wurde die Arbeit vervollständigt. Anläßlich eines Kolloquiums stellte Herr Prof. Dr. med. D. Knorr die Ergebnisse in München am 16.12.1974 dem Sonderforschungsbereich 51 vor.

Im Frühjahr 1975 wurde die Arbeit endgültig fertiggestellt.

Der Direktion der Kinderklinik der Universität München, Herrn Prof. Dr. med. Klaus Betke, spreche ich für die freundliche Aufnahme im Hause und die Überlassung des Arbeitsplatzes aufrichtigen Dank aus.

Herzlicher Dank gebührt vor allem Herrn Prof. Dr. med. Dietrich Knorr für die Vergabe des Themas, für die jahrelange fachliche Betreuung und Leitung, die diese Arbeit ermöglichte, und für das entgegengebrachte Vertrauen und Verständnis.

Für die Überlassung des Cortisol-Antiserums und manchen Ratschlag sei Herrn Dipl. Chem. Dr. F. Bidlingmaier mein Dank gesagt.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Assistentinnen des Hormonlabors, im besonderen Frau Ingeborg Stoll für Ihren unermüdlichen Einsatz, Frau Regina Ehrt und Fräulein Claudia Wohlfarth, für die herzliche Aufnahme und die Durchführung der 17-alpha-Hydroxyprogesteron-Bestimmung. Fräulein Christina Scheungrab schulde ich für die Anfertigung der umfangreichen Schreibarbeiten Dank.

Schließlich danke ich den Ärzten der Kinderklinik, die sich als Versuchspersonen zur Verfügung stellten. Ihr selbstloser Einsatz spiegelt den vorbildlichen Geist wider, von dem unser Forschungsteam getragen wurde.

INHALT:

1.0 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1	Das adrenogenitale Syndrom als Erbkrankheit	Seite	1
1.1.1	Häufigkeit des AGS		
1.1.2	Erfordernis eines Heterozygotentests		
1.1.3	Untersuchungen anderer Autoren an AGS-Heterozygoten		
1.2	Die radioimmunologischen Bestimmungsmethoden	Seite	2
1.2.1	Anwendung und Prinzip des Radioimmunoassays		
1.2.2	Das "ideale Antiserum"		
1.2.3	Analysengang eines Radioimmunoassays		
1.2.4	Empfindlichkeit und Spezifität des Radioimmunoassays		
1.3	Klinisches Material	Seite	5
1.3.1	Die beiden angewandten Analysenverfahren		
1.3.2	Die drei Kollektive von Versuchspersonen		
1.3.3	Die Durchführung der ACTH-Belastung		
1.4	Die Fragestellung	Seite	6

2.0 MATERIAL UND METHODEN

2.1	Reagenzien und Lösungen	Seite	6
2.2	Geräte	Seite	8
2.3	Erstellung einer Methode zur Lösungsmittelverteilung	Seite	9
2.3.1	Begründung der Erfordernis		
2.3.2	Überprüfung des Verteilungskoeffizienten von Cortisol zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff		
2.3.3	Überprüfung des Verteilungskoeffizienten von 17-alpha-Hydroxyprogesteron zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff		
2.3.4	Überprüfung des "quenching effect" von Tetrachlorkohlenstoff bei Flüssigkeitsszintillations-spektrometrie		
2.3.5	Ergebnis der Versuche		

2.4	Einbau der Lösungsmittelverteilung in den Analysengang zur radioimmunologischen Bestimmung von Cortisol i.Pl.	Seite 16
2.4.1	Anschluß an die Extraktion und Einführung einer radioaktiven Wiederfindungskontrolle	
2.4.2	Anschluß an den Radioimmunoassay	
2.4.3	Der fertige Analysengang zur radioimmunologischen Bestimmung von Cortisol im Plasma	
2.5	Die statistische Qualitätskontrolle auf Präzision und Richtigkeit über den gesamten Analysengang von Cortisol i.Pl.	Seite 21
2.5.1	Der Versuchsansatz	
2.5.2	Die Meßwerte	
2.5.3	Wertung der Daten	
2.5.4	Ergebnis der Qualitätskontrolle	
2.6	Die radioimmunologische Bestimmung von 17-alpha-Hydroxyprogesteron im Plasma	Seite 22
2.6.1	Probenaufbereitung und Chromatographie	
2.6.2	Der Radioimmunoassay	
2.6.3	Charakterisierung des Antiserums	
2.6.4	Die statistische Qualitätskontrolle über den gesamten Analysengang von 17-alpha-Hydroxyprogesteron i.Pl.	

3.0 UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

3.1	Das Verhalten der Plasmakonzentration von 17-alpha-Hydroxyprogesteron unter intravenöser ACTH-Belastung bei Normalpersonen und heterozygoten Merkmalsträgern eines adrenogenitalen Syndroms	Seite 26
3.1.1	Die Meßwerte	
3.1.2	U-Test von Wilcoxon	
3.1.3	t-Test nach Student	
3.1.4	Graphische Darstellung	
3.1.5	Wertung der Daten	
3.1.6	Ergebnis der Untersuchungen	
3.2	Das Verhalten der Plasmakonzentration von 17-alpha-Hydroxyprogesteron unter intravenöser ACTH-Belastung bei Kindern mit adrenogenitalem Syndrom	Seite 32
3.2.1	Die Meßwerte	
3.2.2	t-Test nach Student	
3.2.3	Graphische Darstellung	
3.2.4	Wertung der Daten	
3.2.5	Ergebnis der Untersuchungen	

3.3	Das Verhalten der Plasmakonzentration von Cortisol unter intravenöser ACTH-Belastung bei Normalpersonen und heterozygoten Merkmalsträgern eines adrenogenitalen Syndroms. Das Verhältnis der Anstiege der Plasmakonzentrationen von 17-alpha-Hydroxyprogesteron und Cortisol unter intravenöser ACTH-Belastung	Seite	37
3.3.1	Die Meßwerte		
3.3.2	t-Test nach Student		
3.3.3	Graphische Darstellung		
3.3.4	Wertung der Daten		
3.3.5	Ergebnis der Untersuchungen		
3.4	Das Verhalten der Plasmakonzentration von Cortisol unter intravenöser ACTH-Belastung bei Kindern mit adrenogenitalem Syndrom	Seite	43
3.4.1	Die Meßwerte		
3.4.2	Wertung der Daten		
3.4.3	Ergebnis der Untersuchungen		
3.5	Zusammenfassende schematische Darstellung der Ergebnisse	Seite	47
4.0	<u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>		
4.1	Ein Heterozygotentest für das adrenogenitale Syndrom	Seite	48
4.2	Exemplarische Anwendung des Tests zur genetischen Beratung	Seite	49
5.0	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	Seite	50
6.0	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	Seite	51

1.0

Das adrenogenitale Syndrom darf heute mit Sicherheit als Erbkrankheit betrachtet werden. Schon 1929 vermutete H. OREL (1), daß diese Krankheit rezessiv vererblich sei. Erst mehr als 25 Jahre später konnten dann CHILDS und Mitarbeiter (2) anhand eines größeren Krankengutes den Beweis erbringen, daß das adrenogenitale Syndrom autosomal rezessiv vererbt wird. Auch BIRKE und Mitarbeiter (3) sowie PRADER (4a) bestätigen durch eigene Untersuchungen die einfache rezessive Heredität des AGS.

Noch bis vor etwa 15 Jahren war das Syndrom wenig bekannt und galt als selten. PRADER (4b) konnte jedoch die überraschend große Häufigkeit des AGS von 1 : 5000 angeben. Eine in jüngster Zeit abgeschlossene Zehn-jahres-Studie ergibt für München dieselben Werte. (KNORR (11))

Früher, als die Substitutionstherapie mit Corticosteroiden noch nicht möglich war, fand man in der direkten Aszendenz keine Fälle, da, falls überhaupt überlebt wurde, das Syndrom unbehandelt praktisch immer Sterilität bedingte. Heute jedoch, dank der modernen Therapie mit Nebennierenrindenhormonen, überleben die meisten Kinder und werden fertil. Somit ergibt sich die Notwendigkeit gezielter genetischer Beratung dieser Patienten, vor allem bei der Wahl des Ehepartners. Dies setzt allerdings einen brauchbaren Test zur Erkennung der heterozygoten Merkmalsträger voraus. Die besondere Dringlichkeit eines Heterozygotentests für das adrenogenitale Syndrom wird deutlich, wenn man sich die von PRADER (4) errechnete Heterozygotenhäufigkeit von 1 : 37 vor Augen führt.

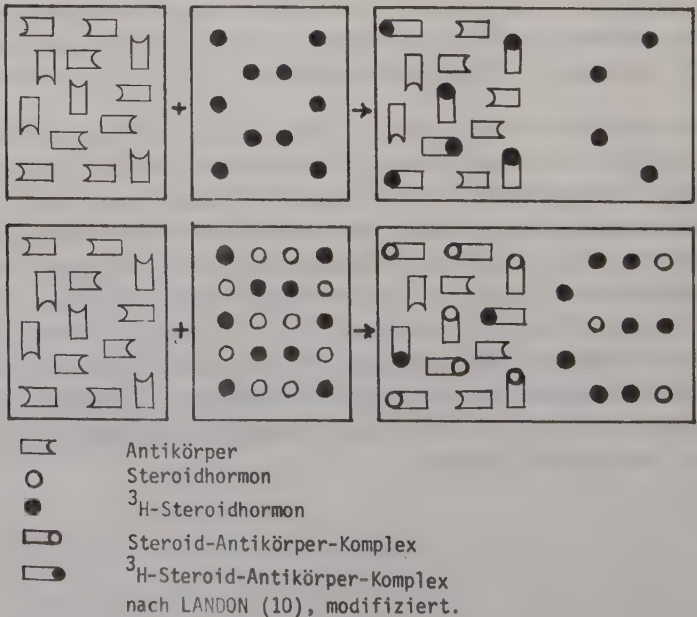
Verschiedene Versuche, einen solchen Test zu erstellen, sind in der Literatur bereits beschrieben. So empfiehlt GLEISPACH (5) die Bestimmung von Pregnantriolon im Harn nach ACTH-Stimulierung. CHILDS (2) gibt die Messung der Ausscheidung von Pregnantriol nach Verabreichung von ACTH an. Über die Auslösung der endogenen ACTH-Stimulierung mittels Metopiron-Test und Überprüfung der Pregnantriolausscheidung im Harn berichten CLEVELAND (6) und BERGADA et al. (7). Schließlich weisen KNORR und BUTENANDT (8) 1968 auf erhöhte Plasmakonzentrationen von 17-alpha-Hydroxyprogesteron bei Eltern von AGS-Kindern hin. Alle diese Untersuchungen erbrachten jedoch keinen befriedigenden Heterozygotentest für das adrenogenitale Syndrom.

Völlig neue Möglichkeiten erschließt uns aber die Einführung der radioimmunologischen Bestimmungsmethoden in die Endokrinologie. Als vor etwa 10 Jahren bekannt wurde, daß Antikörper zur quantitativen Bestimmung von Hormonen in biologischem Material angewandt werden können, setzte in der Hormonanalytik eine stürmische Entwicklung ein. So ist die radioimmunologische Bestimmung von Proteohormonen wie Insulin heute eine durchaus geläufige Routinemethode.

Aber auch gegen die Steroidhormone, die als niedermolekulare Substanzen den nicht antigenen Hormonen zugeordnet sind, konnten in den letzten drei Jahren Antikörper gewonnen werden, und so eröffnete sich der Weg, auch die Steroide mit radioimmunologischer Methodik zu bestimmen. (9)

Die dazu benützte Methode, der Radioimmunoassay (RIA), stellt eine Form der kompetitiven Proteinbindungsanalyse dar, deren Grundprinzip die Konkurrenz radioaktiver und nichtradioaktiver Moleküle der zu bestimmenden Substanz um eine begrenzte Zahl von Bindungsstellen am Antikörper ist. Diese Antigen-Antikörperreaktion ist reversibel und folgt dem Massenwirkungsgesetz. Das Verhältnis von radioaktiv markierten zu nicht markierten Molekülen am Protein entspricht also dem Verhältnis ihrer Mengen im Versuchsansatz.

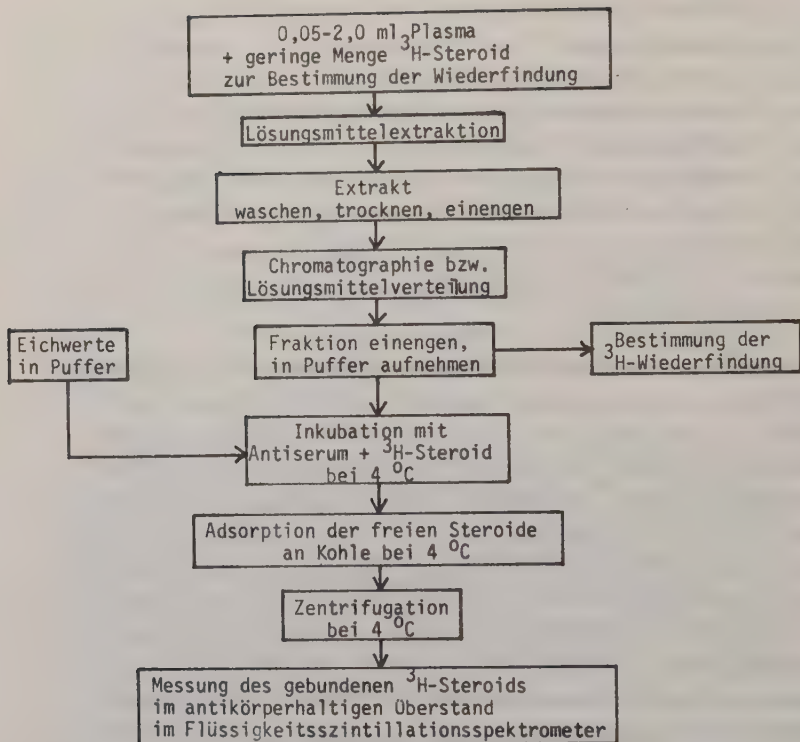
Abb. 1



Da beim RIA nun mit einer konstanten, begrenzten Menge von Antikörpern gearbeitet wird, liegt im Reaktionsgemisch neben den Komplexen stets noch freies Antigen vor. Auch die Menge des radioaktiv markierten Antigens, des sog. Tracers, wird konstant gehalten. Wegen der Konkurrenz um den beschränkt vorhandenen Antikörper wird umso weniger Tracer gebunden, je mehr nicht-markiertes Antigen vorhanden ist. Das Verhältnis von ungebundenem zu gebundenem Tracer erlaubt daher die Berechnung der Menge des gesuchten nicht-markierten Antigens. Dazu erstellen wir für jedes Testsystem entsprechende Eichkurven.

Die größte Bedeutung besitzt demnach die Gewinnung eines geeigneten Antikörpers. Die wichtigste Eigenschaft eines Antiserums ist seine Spezifität, das heißt seine Affinität zu einem bestimmten Steroid und seine Fähigkeit, zwischen dem Steroid und anderen in der Probe vorhandenen Stoffen, insbesondere anderen Steroiden, zu unterscheiden. Leider wurde bisher kein ideales Antiserum gewonnen; ein solches wiese praktisch keinerlei Kreuzreaktivität mit anderen Steroiden auf und würde uns somit die direkte Bestimmung von Steroidhormonen in biologischen Flüssigkeiten ermöglichen. Solange jedoch "ideale Antiseren" nicht verfügbar sind, muß das zu messende Steroid zunächst aus der biologischen Flüssigkeit extrahiert und gegebenenfalls isoliert und gereinigt werden. Dazu stehen uns die verschiedenen Methoden der Chromatographie, wie Papier-, Dünnschicht- oder Säulenchromatographie, sowie die Lösungsmittelverteilung, zur Verfügung.

Der Analysengang zur radioimmunologischen Bestimmung eines Steroidhormons aus Plasma läßt sich also folgendermaßen schematisch darstellen (nach BIDLINGMAIER (9), modifiziert):



Der Radioimmunoassay zählt zu den empfindlichsten, spezifischsten und genauesten Analyseverfahren, über welche die Wissenschaft verfügt. Selbst Konzentrationen von Picogramm pro Milliliter lassen sich oft noch einwandfrei bestimmen. Teilweise liegt die Größenordnung der erfaßbaren Menge sogar bei einem trillionstel Gramm (10^{-15} g) (10). Seine außerordentliche Empfindlichkeit verdankt der Radioimmunoassay der Verwendung von radioaktiven Isotopen, zum anderen der hohen Affinität der eingesetzten Antikörper. Die extreme Spezifität hat der RIA mit allen anderen immunologischen Methoden gemeinsam.

Die vorliegende Arbeit bedient sich der radioimmunologischen Analyseverfahren zur quantitativen Bestimmung zweier Steroidhormone:

1. des Cortisols im Plasma und
2. des 17-alpha-Hydroxyprogesterons im Plasma.

Die Bestimmung des 17-OH-Prog.i.Pl. wird mittels RIA nach der in 2.6 beschriebenen Methode von den medizinisch-technischen Assistentinnen des Hormonlabors durchgeführt.

Die Bestimmung des Cortisols im Plasma wird mittels RIA nach der in 2.4.3 angegebenen Methode von mir selbst durchgeführt. Diesem RIA geht eine selbstentwickelte Lösungsmittelverteilung voraus, deren Erfordernis in 2.3.1 begründet und deren Entwicklung ab 2.3.2 dargestellt ist.

Untersucht wird das Verhalten der Plasmakonzentrationen des Cortisols sowie des 17-OH-Progesterons unter intravenöser ACTH-Belastung bei drei Kollektiven.

Diese sind:

- 1.0 Normalpersonen (mutmaßlich genetisch unbelastete Personen)
VP 1-17
- 2.0 Heterozygote Merkmalsträger eines AGS (AGS-Eltern)
VP 18-47
- 3.0 Homozygote Merkmalsträger eines AGS (AGS-Kinder)
 - 3.a C 21-Hydroxylase-Insuffizienz, substituiert
VP 48-77
 - 3.b C 11-Hydroxylase-Insuffizienz, substituiert
VP 78, 79
 - 3.c AGS-Kinder, unbehandelt
VP 80, 81, 82

Die ACTH-Belastung führen wir als intravenöse Stimulation mit 0,25 mg Synacthen^R (CIBA-GEIGY) durch. Unmittelbar VOR sowie 60 Minuten NACH der ACTH-Gabe werden den Probanden je 10 ml Venenblut entnommen und mit Heparin versetzt. Auf diese Weise gewinnen wir von jeder Testperson zwei Plasmaproben, die der quantitativen Bestimmung der beiden genannten Steroidhormone zugeführt werden. Wegen der starken

tageszeitlichen Schwankung der Plasmaspiegel der Nebennierenrindenhormone, besonders des Cortisols, wäre die ACTH-Belastung bei allen Testpersonen zur selben Tageszeit anzustreben. Bei den Kollektiven 2.0 und 3.0 war dies aus organisatorischen Gründen nicht möglich. Da sich dankenswerterweise ein Teil der Ärzteschaft der Universitäts-Kinderklinik München und einige Kollegen als Versuchspersonen zur Verfügung stellten, gelang wenigstens beim Normalkollektiv die einheitliche Durchführung der ACTH-Belastung zur selben Uhrzeit, nämlich von 11 bis 12 Uhr mittags.

Abgesehen vom Kollaps einer psychovegetativ labilen Versuchsperson traten während der intravenösen Synacthen-Belastung bei keiner Person Nebenwirkungen auf. Lediglich das Eintreten eines Hungergefühls wurde von nahezu allen Versuchspersonen angegeben.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse soll schließlich zeigen, ob und wie sich homozygote und heterozygote Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms unter ACTH-Belastung im Anstieg zweier wichtiger Steroidhormone von mutmaßlich genetisch unbelasteten Personen unterscheiden und ob diese Unterschiede statistisch signifikant sind, sodaß ein brauchbarer Heterozygotentest für das AGS daraus abgeleitet werden kann.

2.0 MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien

- (1) Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4) p.a.
Merck, Darmstadt
- (2) Natriumazid (NaN_3)
Merck, Darmstadt
- (3) di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
Merck, Darmstadt
- (4) Dichlormethan p.a.
Merck, Darmstadt
- (5) Tetrachlorkohlenstoff p.a.
Merck, Darmstadt

- (6) Benzol p.a.
Merck, Darmstadt
- (7) Methanol
Merck, Darmstadt
- (8) Äthanol absolut p.a.
Merck, Darmstadt
- (9) Diäthyläther pro narcosi
Hoechst, Frankfurt/Main
- (10) Dioxan reinst
Merck, Darmstadt
- (11) Naphthalin für Szintillationsmessungen
Merck, Darmstadt
- (12) PPO (2,5 - Diphenyloxazole)
Koch-Light Laboratories Ltd. England
- (13) POPOP (1,4-bis-2-(-5-Phenyloxazolyl)-Benzene)
Zinsser, Frankfurt/Main
- (14) Hydrocortison
Merck, Darmstadt
- (15) 17-alpha-Hydroxyprogesteron Standardsubstanz
u.a Steroide
Merck, Darmstadt
- (16) (1,2-³H-) Cortisol
49 Ci/mmol
Buchler, Braunschweig
- (17) 17-alpha-Hydroxyprogesterone-1,2-³H
49,2 Ci/mmol
New England Nuclear Chemicals, Dreieichenhain
- (18) Gamma-Globulin vom Rind, trocken, reinst
Behringwerke Marburg
- (19) Dextran T 70
Pharmacia Uppsala, Schweden

- (20) Sephadex LH 20
Pharmacia, Frankfurt/Main
- (21) Norit A pract.
Serva, Heidelberg

Alle Lösungen und Verdünnungen wurden mit Aqua destillata steril pro inj. DAB 7 angesetzt.

Lösungen

- (1) PO_4 -Gamma-Globulin-Puffer pH 7,2:
2,686 g KH_2PO_4
8,356 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
0,325 g NaN_3
1,000 g Gammaglobulin vom Rind
Aqua dest. ad 1.000,0
- (2) Kohle-Dextran-Lösung:
50 mg Dextran T 70
500 mg Norit A
Puffer ad 100,0
- (3) Szintillator-Lösung:
250,00 g Naphthalin
17,50 g PPO
0,75 g POPOP
lösen in 2500 ml Dioxan
- (4) Cortisol-Stammlösung:
4 mg Cortisol in 100,0 ml Äthanol lösen,
0,1 ml von dieser Lösung mit Puffer auf 100,0 ml auffüllen.

Geräte

- (1) Liquid Szintillation Spectrometer
Tri-Carb, Modell 3320
PACKARD
- (2) DIEHL algotronic
Elektronenrechner

- (3) Roto Silenta K, D 72
Kühlzentrifuge
Hettich, Tuttlingen
- (4) Thermoblock T 34
Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
- (5) Whirlmix
Cenco, Niederlande
- (6) Magnetic Stirrer
Cenco, Niederlande
- (7) Wärmeofen Heraeus TA 500

Alle Glaswaren wurden vor Verwendung bei 500⁰ C ausgeglüht, um Verunreinigungen, besonders durch störende Steroide, zu beseitigen (KNORR (23)).

2.3 Erstellung einer Methode zur Lösungsmittelverteilung

Wie in 1.2.2 bereits dargestellt, wurde bisher leider noch kein "ideales Antiserum" gegen ein Steroidhormon gewonnen. So weist auch unser Antiserum 127, das Herr Dipl. Chem. Dr. F. Bidlingmaier im Kaninchen gewann, erhebliche Kreuzreaktivität gegen eine ganze Anzahl anderer Steroidhormone auf. (Tab. 1)

Tab. 1:

Antikörper 127 gegen das C 21-Hemisuccinat-BSA-Konjugat des Cortisons

KREUZREAKTIONEN:	
Cortison	100 %
Cortisol	100 %
17-OH-Progesteron	95 %
Progesteron	28 %
Desoxycorticosteron	20 %
Corticosteron	14 %
Testosteron	8 %
Androstendion	1 %
Aldosteron	1 %
Oestradiol	0,01 %
Oestron	0,01 %
17-OH-Pregnenolon	0,01 %
DHA	0,01 %

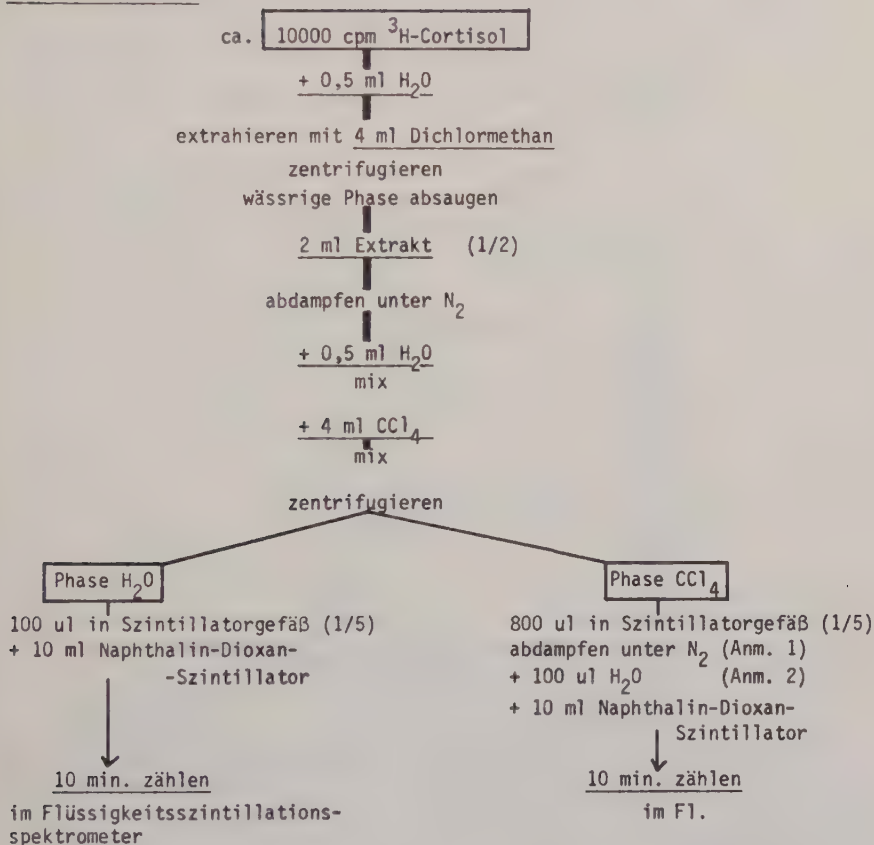
Wegen der starken Kreuzreaktion mit 17-alpha-Hydroxyprogesteron lägen die bei Verwendung dieser Antikörper gemessenen Plasmakonzentrationen von Cortisol fälschlich zu hoch. In der klinischen Routine könnte dieser Fehler vernachlässigt werden, da die Plasmakonzentration von Cortisol normalerweise in der Größenordnung von 10 ug/100 ml, diejenige von 17-alpha-Hydroxyprogesteron bei 100 ng/100 ml liegt, also um den Faktor 100 kleiner ist und somit nicht ins Gewicht fällt. Beim adrenogenitalen Syndrom jedoch, wo die Insuffizienz der C 21-Hydroxylase zu einem gewaltigen Anstau von 17-OH-Progesteron führt (bei einigen Kindern aus unserem Kollektiv (3) sind unter Ruhebedingungen Plasmakonzentrationen von 25000 ng/100 ml und mehr gemessen worden) - ist die Abtrennung dieses Steroids unerlässlich, da sonst die erhaltenen Cortisolwerte außerordentlich stark verfälscht und somit unbrauchbar sind.

Zur Abtrennung des 17-alpha-Hydroxyprogesterons vom Cortisol bieten sich unterschiedliche Verfahren an, etwa eine Methode aus den verschiedenen Arten der Chromatographie oder die von uns gewählte Lösungsmittelverteilung (PHAM-HUU-TRUNG (13)). Das Cortisol löst sich sehr gut in Wasser und schlecht in Tetrachlorkohlenstoff; das 17-alpha-Hydroxyprogesteron dagegen ist sehr gut löslich in Tetrachlorkohlenstoff und schlecht löslich in Wasser. Diese Verhältnisse werden im folgenden überprüft, um ein geeignetes Verfahren zur Lösungsmittelverteilung unserer beiden Steroide zwischen Tetrachlorkohlenstoff und Wasser zu erstellen und dieses zwischen die Extraktion der Steroide aus dem Plasma und den eigentlichen Radioimmunoassay für Cortisol einzubauen.

Überprüfung des Verteilungskoeffizienten von Cortisol zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff

Dazu wird folgender Versuch, jeweils im zehnfachen Ansatz, unternommen:

1. Versuchsansatz



Anm. 1: Tetrachlorkohlenstoff "quencht" bei Flüssigkeitsszintillationszählung mit Naphthalin-Dioxan-Szintillator, d.h. er verändert durch seine Anwesenheit die Anzahl der gemessenen Counts. Dies dann durch 70-minütiges Abdampfen des CCl₄ unter Stickstoff bei 40° Celsius vermieden werden (Nachweis durch Nebenversuch 2.3.4).

Anm. 2: Die Zugabe von 100 ul Wasser erfolgt, um in beiden Phasen gleiche Bedingungen zu erhalten.

2. Meßwerte

(alle Meßwerte in counts pro 10 min.)

(a) eingesetztes ^3H -Cortisol:

106193
99770 $\rangle$ 102981 (M.W.)

(b) gefunden in Phase H_2O :

8117
8055
8595
8327
7887
8246
8032
8395
8114
8620 $\rangle$ M.W. 8239 (1/10) korr. 82390

(c) gefunden in Phase CCl_4 :

203
245
211
245
277
390
259
242
277
235 $\rangle$ M.W. 258 (1/10) korr. 2580

3. Auswertung

(a) ^3H -Cortisol, insgesamt gefunden:

$82390 + 2580 = 84970$

Einsatz: 102981 (100 %)

mittlere Wiederfindung: 82,5 %

(b) ^3H -Cortisol in Wasser (prozentual):

$82390 \text{ von } 102981 = 80,00 \%$

(c) ^3H -Cortisol in Tetrachlorkohlenstoff (prozentual):

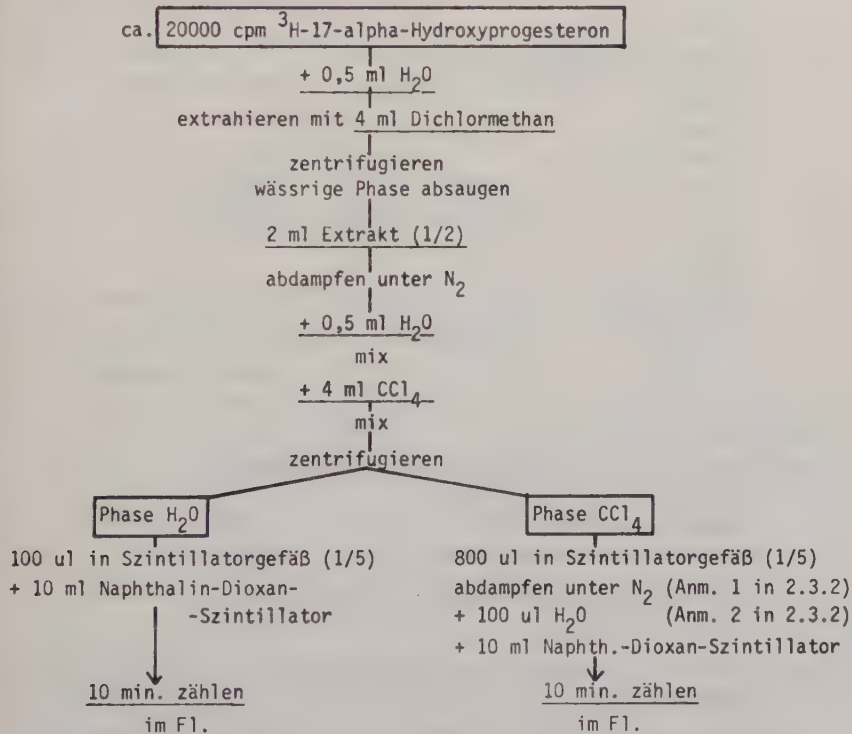
$2580 \text{ von } 102981 = 2,50 \%$

(d) Verteilungskoeffizient von ^3H -Cortisol ($\text{H}_2\text{O}/\text{CCl}_4$): $K_1 = 32$

Oberprüfung des Verteilungskoeffizienten von 17- α -Hydroxyprogesteron zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff

Dazu wird folgender Versuch, jeweils im zehnfachen Ansatz, unternommen:

1. Versuchsansatz



2. Meßwerte

(alle Meßwerte in counts pro 10 min.)

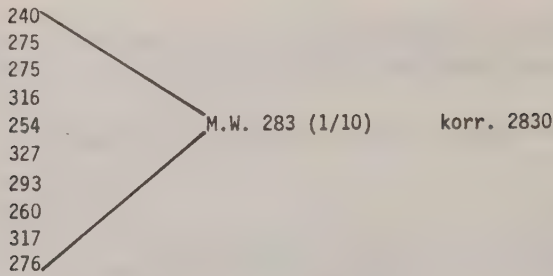
(a) eingesetztes ^3H -17- α -Hydroxyprogesteron:

194246

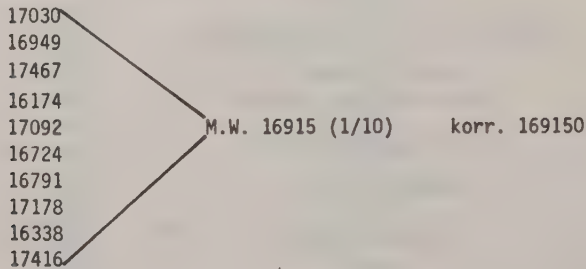
193191

M.W. 193718

(b) gefunden in Phase H_2O :



(c) gefunden in Phase CCl_4 :



3. Auswertung

- (a) 3H -17- α -Hydroxyprogesteron, insgesamt gefunden:
 $2830 + 169150 = 171980$
Einsatz: 193718 (100 %)
mittlere Wiederfindung: 88,8 %
- (b) 3H -17-OH-Progesteron in Wasser (prozentual):
 2830 von $193718 = 1,4 \%$
- (c) 3H -17-OH-Progesteron in Tetrachlorkohlenstoff (prozentual):
 169150 von $193718 = 87,4 \%$
- (3) Verteilungskoeffizient von 3H -17-OH-Prog. (H_2O/CCl_4): $K_2 = 1/62$

Nebenversuch:

Überprüfung des "quenching effect" von Tetrachlorkohlenstoff bei Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie mit Naphthalin-Dioxan-Szintillator:

Dazu werden drei Versuche durchgeführt
(alle Meßwerte in counts pro 5 min.):

V 1: Messung von 100 μ l ^3H -Cortisol in 10 ml Naphthalin-Dioxan-Szintillator (fünffacher Versuchsansatz):

Meßwerte:	49233		M.W. 49894
	47836		
	49138		
	53375		
	49888		

V 2: Messung von 100 μ l ^3H -Cortisol + 200 μ l CCl_4 in 10 ml N.-D.-Szintillator (zehnfacher Versuchsansatz):

Meßwerte:	5220		M.W. 4713
	4431		
	3749		
	5038		
	4713		
	4725		
	4685		
	4838		
	4822		
	4909		

V 3: Abdampfen von 200 μ l CCl_4 unter Stickstoff (70 min. bei 40°C), dann Zugabe von 100 μ l ^3H -Cortisol und Messung in 10 ml N.-D.-Szintillator (zehnfacher Versuchsansatz):

Meßwerte:	49111		M.W. 49390
	51295		
	50467		
	50759		
	49634		
	46738		
	47899		
	50282		
	48441		
	49280		

Auswertung des Nebenversuchs:

- | | |
|--|--|
| (a) mittlerer Ausgangsmeßwert: | 49894 cp5m, entspr. 100 % |
| (b) mittlerer Meßwert mit CCl_4 : | 4713 cp5m, entspr. 9,4 %
des Ausgangsmeßwertes |
| (c) mittlerer Meßwert nach Abdampfen: | 49390 cp5m, entspr. 99 %
des Ausgangsmeßwertes. |

Ergebnis des Nebenversuchs:

Die Anwesenheit von Tetrachlorkohlenstoff im Szintillatorgefäß bewirkt eine starke Unterdrückung der Count-Zahlen. Die gemessenen Werte liegen durchschnittlich 91 % zu tief ("quenching effect"). Nach 70-minütigem Abdampfen des Tetrachlorkohlenstoff unter Stickstoff bei 40°C entsprechen die gemessenen Werte wieder 100 %.

Ergebnis der Versuche:

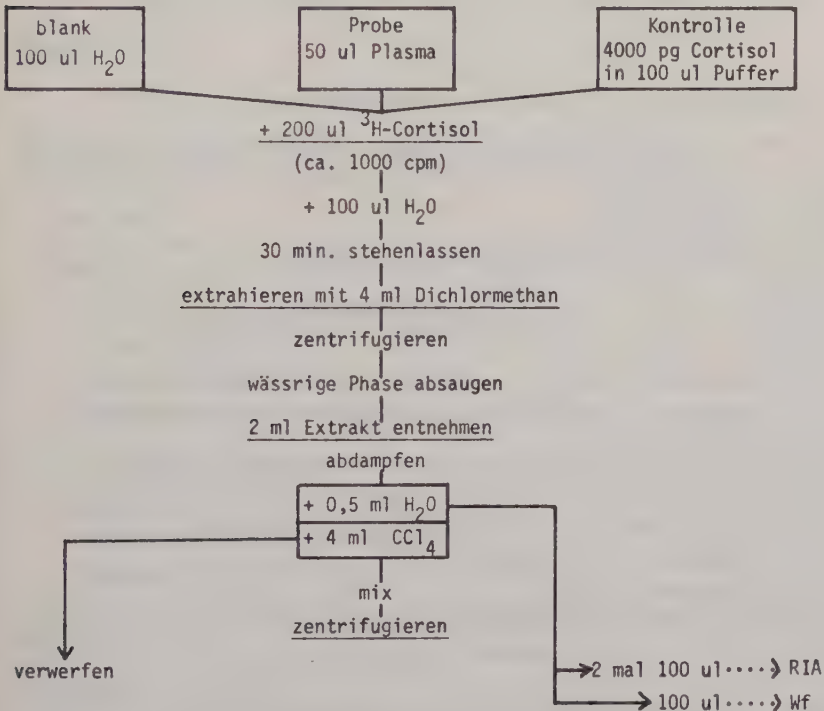
Diese Versuche zeigen, daß die Lösungsmittelverteilung zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff eine geeignete Methode ist, das 17-alpha-Hydroxyprogesteron vom Cortisol abzutrennen (PHAM-HUU-TRUNG (13)). Der Verteilungskoeffizient K_1 von ^3H -Cortisol zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff beträgt 32. Der Verteilungskoeffizient K_2 von ^3H -17-alpha-Hydroxyprogesteron zwischen Wasser und Tetrachlorkohlenstoff beträgt dagegen 1/62.

Der Quench-Effekt des Tetrachlorkohlenstoffes im Szintillator wird durch 70-minütiges Abdampfen unter Stickstoff bei 40°C vor der Zählung ausgeschaltet.

2.4

Damit der Analysengang der radioimmunologischen Bestimmung von Cortisol zu einer Einheit zusammenschmilzt, muß nun die Lösungsmittelverteilung so in die Standardmethode eingebaut werden, daß wir einerseits Anschluß an die Extraktion gewinnen und andererseits mit der wässrigen "Cortisol-Phase" in den RIA eingehen können. Außerdem wollen wir über den gesamten Extraktions- und Verteilungsvorgang hinweg eine Wiederfindungskontrolle mit wenig aktivem ^3H -Cortisol durchführen, um eventuelle Verluste genau korrigieren zu können.

Den Anschluß der Lösungsmittelverteilung an die Extraktion der Steroide aus dem Plasma haben wir im Wesentlichen in den Versuchen 2.3.2 und 2.3.3 bereits vollzogen. Zusätzlich wollen wir jedoch eine Wiederfindungskontrolle sowie einen Reagenzienleerwert ("blank") und einen Kontrollwert (4000 pg Cortisol) mitführen, sodaß sich folgender Analysengang ergibt:



Der letzte Schritt ist nun, an die Lösungsmittelverteilung den Radioimmunoassay anzuschließen. Da wir mit der wässrigen Phase in den RIA eingehen wollen, die Eichwerte der Standardmethode aber in Puffer gelöst vorliegen, ergibt sich die Notwendigkeit, nachzuweisen, daß unsere 100 ul Wasser das Gleichgewicht des Radioimmunoassays nicht stören. Immerhin sind auch Antikörper und Tracer in Puffer gelöst, sodaß zusammen im Reaktionsgemisch 600 ul Puffer vorhanden sind, die gegenüber 100 ul Wasser eigentlich ausreichen müßten, das Gleichgewicht des Systems stabil zu halten.

Als Nachweis erstellen wir zwei Eichkurven, wovon eine das Cortisol in PO_4 -Gammaglobulin-Puffer, die andere das Cortisol in Wasser gelöst enthält. Wir fordern die Gleichheit beider Eichkurven. Das Gammaglobulin im Puffer steigert die Empfindlichkeit des RIA, indem es die Adsorption von Antikörper an die Kohle und von Steroiden an die Glaswand verhindert. Dabei haben höhere Konzentrationen an Gammaglobulin als 1 mg/ml keinen besseren Effekt, als niedrigere (LEYENDECKER (22)).

1. Versuchsansatz (alle Werte im vierfachen Ansatz):

St	0	50 pg	100 pg	200 pg	1000 pg	2000 pg	4000 pg	Cortisol
100 u1 Puffer	100 u1 Puffer	Eichlsg. (Anm.)	E.	E.	E.	E.	E.	
100 u1 ^3H -Cort	=	=	=	=	=	=	=	
500 u1 AK 127	=	=	=	=	=	=	=	

30 sek. schütteln, mit Aluminiumfolie verschließen, 2 - 4 Std. Kühl-schrank; im Eisbad:

500 u1 Puffer	500 u1 Kohle	=	=	=	=	=	=
---------------	--------------	---	---	---	---	---	---

30 sek. schütteln, 10 min. Eisbad

10 min. Kühlzentrifuge (4°C)

Oberstand in 10 ml N.-D.-Szintillator dekantieren

zählen im Flüssigkeits szintillationsspektrometer.

Anm.: Eichlösung in Puffer und in Wasser (jeweils vierfach)!

2. Meßwerte (alle Meßwerte in min. pro 10.000 counts!):

	St	0	50	100	200	1000	2000	4000 pg	Cortisol
<u>Puffer</u>	1.65	3.62	4.08	5.02	6.20	14.37	21.36	31.10	
	1.60	3.71	4.12	4.90	5.96	13.50	20.77	30.12	
		3.69	4.14	4.62	5.80	13.67	20.87	29.81	
		3.54	4.05	4.74	6.68	13.76	21.27	30.52	
<u>Wasser</u>	1.57	3.49	4.23	4.70	6.64	15.25	25.15	32.26	
	1.57	3.36	4.29	5.03	6.84	16.45	23.93	30.55	
		3.25	4.39	5.01	6.75	16.41	23.29	32.34	
		3.32	4.14	5.06	6.23	16.08	24.49	30.64	

3. Auswertung

Errechnung der linearen Regression (DIEHL algotronic Progr. 40505):

(a) Eichwerte in PO₄-Gammaglobulin-Puffer

Regressionsgerade : $y = 0,0068 x + 4,81$

Regressionskoeffizient : $r = 0,9863$

Streuung der Regressionsgeraden : 2,2436

(b) Eichwerte in Wasser

Regressionsgerade : $y = 0,0073 x + 5,35$

Regressionskoeffizient : $r = 0,9684$

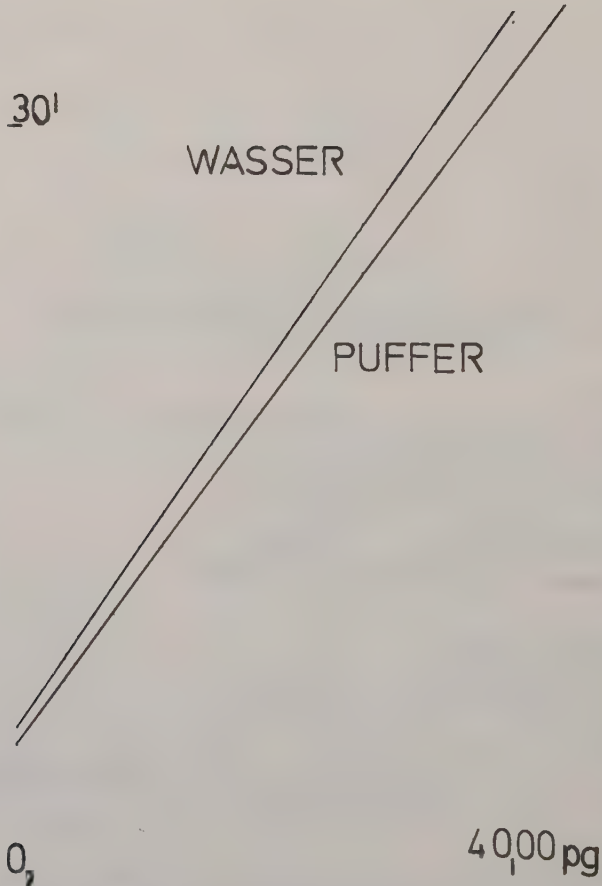
Streuung der Regressionsgeraden : 2,8050

graphische Darstellung der beiden Regressionsgeraden siehe Abbildung 2, Seite 20.

4. Ergebnis

Die Eichkurven in PO₄-Gammaglobulin-Puffer und in Wasser sind unter Berücksichtigung der zufälligen Abweichung praktisch gleich. Wir dürfen also mit der wässrigen Phase in den Radioimmunoassay eingehen. Die 600 ul Puffer aus Antikörper und Tracer halten offensichtlich gegenüber 100 ul Wasser das Gleichgewicht des Systems stabil.

Abbildung 2:



Darstellung der errechneten Regressionsgeraden (Eichkurven),
wovon eine das Cortisol in PO_4 -Gammaglobulin-Puffer, die an-
dere das Cortisol in Wasser gelöst, enthält
(Abszisse: eingesetztes Cortisol in pg;
Ordinate: gezählte Minuten pro 10.000 counts).

Somit steht der gesamte Analysengang zur radioimmunologischen Bestimmung des Cortisols im Plasma fest. An die in 2.4.1 angegebene Extraktion und Lösungsmittelverteilung schließen wir den RIA nach folgendem Schema an:

	St	0	50	100	200	400	1000	2000	blank	Proben	Kontrolle
100 µl	Puffer	Puffer	Eichl.	=	=	=	=	=	=	Extrakt	Extrakt
100 µl	³ H-Cort.	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
500 µl	Anti-körper	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	30 sek. schütteln, mit Aluminiumfolie verschließen, 2-4 Std. Kühlschrank										
500 µl	Puffer	Kohle	=	=	=	=	=	=	=	=	=

30 sek. schütteln, 10 min. Eisbad

10 min. Kühlzentrifuge (3500 upm, 4° C)

Überstand in 10 ml Naphthalin-Dioxan-Szintillator dekantieren, zählen im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer.

Berechnung:

Aus der angegebenen Methode ergibt sich folgende Berechnungsformel:

Wf-korrigierter pg-Wert mal 0,02 → (ug/100 ml) Cortisol!

2.5

Zur Absicherung der Methode führe ich noch die statistische Qualitätskontrolle durch.

Dazu wird eine 10-fach-Bestimmung aus 10 mal 50 µl Poolserum vorgenommen.

1. Meßwerte: St: 1.24 min./10.000 c.
1.24 min./10.000 c.

blank: 0 pg Cortisol
0 pg Cortisol

Kontrolle: $\left. \begin{matrix} 378 \\ 420 \end{matrix} \right\}$ M.W. 399 pg (soll: 400 pg) Cortisol

Proben:	11,48	} (ug/100 ml Cortisol)
	12,24	
	11,56	
	12,56	
	12,20	
	12,80	
	11,72	
	11,76	
	12,26	
	12,16	

2. Auswertung:

Statistische Qualitätskontrolle (DIEHL algotronic Progr. 40103):

n = 10

M.W. 12,074

Varianz 0,18

Standardabweichung 0,43

Variationskoeffizient 3,58 %

2 s - Bereich (M.W. $\pm$ 2 s): 11,20 - 12,94

3. Ergebnis:

Der BLANK ergibt 0 pg Cortisol.

Der Kontrollwert (soll 400 pg) wird ideal erreicht (399 pg).

Alle Meßwerte liegen im 2-s-Bereich.

Der Variationskoeffizient ist 3,5 %.

Die Methode erfüllt somit ausgezeichnet die Forderungen der statistischen Qualitätskontrolle auf Präzision und Richtigkeit.

2.6 Die radioimmunologische Bestimmung von 17-alpha-Hydroxyprogesteron im Plasma (SCHNAKENBURG (12))

Antikörper gegen 17-OH-Prog. wurden von Kaninchen gewonnen, die mit an Rinderalbumin gekoppeltem 17-alpha-Hydroxyprogesteron-3-carboxymethyloxim immunisiert worden waren. Das Antiserum mit der höchsten Spezifität wurde ohne weitere Behandlung in einer Verdünnung von 1 : 10.000 verwendet.

Probenaufbereitung mit chromatographischer Reinigung des 17-OH-Prog.:

Die für eine Bestimmung eingesetzte Plasmamenge richtet sich nach der vom klinischen Bild her zu erwartenden 17-OH-Prog.-Konzentration. In Zweifelsfällen werden mehrere Ansätze durchgeführt. (s. Tab. 2) Zur Kontrolle von Verlusten wird das mit Aqua dest. auf 2 ml aufgefüllte Plasma mit 1200 cpm ^3H -17-OH-Prog. versetzt. Anschließend wird mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die gesamte organische Phase wird in ein Spitzröhrchen übergeführt und unter Stickstoff abgedampft. Es folgt die Chromatographie auf Sephadex LH 20. Als Laufmittel dient Benzol : Aethanol = 95 : 5, Gelbett 15 cm mal 0,7 cm. Der trockene Extrakt wird in 250 μl Benzol/Aethanol 95 : 5 gelöst und auf die Säulen übertragen. Die Gläschen werden noch einmal mit 250 μl nachgespült, dann wird die Chromatographie gestartet. Nach 6 ml läßt sich das 17-OH-Prog. in einer 2 ml großen Fraktion auffangen. Die Position der Fraktion ist unter gleichen Temperaturbedingungen konstant. Nach Spülen mit 50 ml Laufmittel sind die Säulen sofort wieder verwendbar.

Das Eluat wird unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in Puffer gelöst, dessen Menge sich nach der Höhe der zu erwartenden Werte richtet. Jeweils 1/10 davon wird zur Bestimmung der radioaktiven Wiederfindung in Szintillationsgefäße pipettiert und gezählt, 2 mal 100 μl der Lösungen gehen als Doppelansatz in den Radioimmunoassay ein.

Im Einzelnen werden folgende Aliquotierungen vorgenommen:

Tab. 2

erwarteter Wert ng/100 ml	eingesetztes Plasma μl	Extrakt gelöst in μl	Vol. für Recovery (μl)
↖ 300	500	250	25
↖ 1000	250	500	50
↖ 10000	100	1000	100
↖ 100000	50	1000	100

Der Radioimmunoassay:

Jeweils 100 μl des in Puffer gelösten Extraktes werden in den RIA eingesetzt. Nach Zugabe von 12.000 cpm ^3H -17-OH-Prog. in 100 μl Puffer und 500 μl Antiserumverdünnung (1 : 10.000) wird das Gemisch 30 sek. geschüttelt und 2 Std. im Eisbad inkubiert. Anschließend erfolgt die

Trennung der gebundenen von den ungebundenen Steroiden mit 500 μ l Kohle/Dextran-Gemisch in Puffer. Nach erneuter Inkubation von 10 min. in Eiswasser wird 10 min. lang bei $2 - 4^{\circ}$ C zentrifugiert. Der Überstand, der die antikörpergebundenen Steroide repräsentiert, wird in Szintillationsgefäße dekantiert und 5 min. gezählt. In gleicher Weise wird eine Eichkurve mit Standardlösungen angefertigt, die 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800 pg 17-OH-Progesteron in 100 μ l Puffer enthalten.

Jede Testreihe wird kontrolliert, indem ein Röhrchen mit 2 ml Aqua dest. ("blank") sowie 2 Röhrchen mit 200 pg bzw. 600 pg 17-OH-Progesteron in 2 ml Aqua dest. durch die Methode geführt werden.

Charakterisierung des Antiserums:

500 μ l des 1 : 10.000 verdünnten Antiserums binden 66 pg 17-OH-Prog. zu 50 %.

Die Spezifität des Antikörpers geht aus Tab. 3 hervor. Getestet wurden 20 Steroide, die entweder wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem 17-OH-Prog. oder wegen ihrer hohen Blutspiegel von Bedeutung sind. Gleichzeitig ist die Fraktionierung der getesteten Steroide auf der oben beschriebenen Säule dargestellt. Das mit 40 % deutlich kreuzreagierende Progesteron wird durch den chromatographischen Schritt völlig abgetrennt.

Es zeigt sich, daß nur Steroide, die vor dem Enzymblock beim AGS vom C 21-Typ liegen, nennenswert kreuzreagieren.

Tab. 3:

KREUZREAKTIONEN verschiedener Steroide
mit dem 17 OH-PROGESTERON-C3-
ANTISERUM

Steroid	Prozent Bindung	Fraktion, LH-20-Säule, 16 cm									
		1	3	5	7	9	11	13	15	17	ml
17 OH-Progest.	100										
Progesteron	40										
17 OH-Pregnenolon	6,25										
Desoxycortisol	4,5										→
DOC	0,8										→
Corticosteron											→
Cortisol											→
Aldosteron											→
Androstendiol											→
Androstendion											→
DHA	< 0,2										→
Androsteron											→
Testosteron											→
Aetiocholanolon											→
Epitestosteron											→
Dihydrotesto.											→
Oestradiol											→
Oestron											→

Qualitätskontrolle:

Die Variabilität innerhalb der Serie und von Tag zu Tag wurde geprüft. Die Empfindlichkeit der Methode, berechnet aus Blank + 2 SD, beträgt 16,3 pg pro Assayröhrchen. Praktisch bedeutet das, daß bei unserer Aliquotierung 20 ng/100 ml Plasma von Null unterschieden werden können.

3.0 UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

3.1.0 Das Verhalten der Plasmakonzentration von 17-alpha-Hydroxyprogesteron unter intravenöser ACTH-Belastung bei Normalpersonen und heterozygoten Merkmalsträgern eines adrenogenitalen Syndroms

Die Meßwerte:

KOLLEKTIV (1): NORMALPERSONEN				
VP No.	Geschlecht	17-OH-Prog.i.Pl. vor Synacthen (ng/100 ml)	17-OH-Prog.i.Pl. nach Synacthen (ng/100 ml)	Anstieg 17-OH-Prog. ng/100 ml)
1	m	179	370	191
2	m	154	230	76
3	m	188	350	162
4	m	227	354	127
5	m	220	388	168
6	m	83	293	210
7	m	215	298	83
8	m	159	456	297
9	m	96	244	148
10	m	194	340	146
11	m	37	82	45
12	m	186	354	168
13	m	162	203	41
14	w	40	190	150
15	m	92	300	208
16	m	236	420	184
17	w	108	269	161
Mittelwert		151,5	302,4	150,8
kleinster Wert		37 (VP 11)	82 (VP 11)	41 (VP 13)
größter Wert		236 (VP 16)	456 (VP 8)	297 (VP 8)
Standardabweichung		64,0	93,3	64,0
Variationskoeffizient		42,2 %	30,8 %	42,4 %

KOLLEKTIV (2): AGS-ELTERN				
VP No.	Geschlecht	17-OH-Prog.i.Pl. vor Synacthen (ng/100 ml)	17-OH-Prog.i.Pl. nach Synacthen (ng/100 ml)	Anstieg 17-OH-Prog. (ng/100 ml)
18	w	62	329	267
19	w	71	414	343
20	m	92	590	498
21	w	54	269	215
22	w	37	255	218
23	w	196	392	196
24	w	110	329	219
25	m	111	500	389
26	m	149	655	506
27	w	360	1030	670
28	m	160	875	715
29	w	48	340	292
30	m	122	540	418
31	m	161	810	649
32	w	92	794	702
33	m	262	477	215
34	w	41	483	442
35	m	120	400	280
36	w	39	466	427
37	w	26	1180	1154
38	m	192	762	570
39	w	29	246	217
40	m	55	694	639
41	m	240	800	560
42	w	371	520	149
43	m	845	7800	6955
44	m	92	383	291
45	m	257	893	636
46	w	238	413	175
47	w	116	1101	985
Mittelwert		158,2	824,6	666,4
kleinster Wert		26 (VP 37)	246 (VP 39)	149 (VP 42)
größter Wert		845 (VP 43)	7800 (VP 43)	6955 (VP 43)
Standardabweichung		160,1	1342,3	1212,6
Variationskoeffizient		101,1 %	162,7 %	181,9 %
ohne Berücksichtigung von VP 43:				
Mittelwert		134,5	584,1	449,5
kleinster Wert		wie oben		
größter Wert		371 (VP 42)	1180 (VP 37)	1154 (VP 37)
Standardabweichung		95,5	261,9	249,1
Variationskoeffizient		70,9 %	44,8 %	55,4 %

Versuchsperson 43 ist, nach dem außerordentlich großen Anstieg an 17-OH-Prog. zu urteilen, wahrscheinlich homozygoter Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms.

Vergleich der Mittelwerte des Anstiegs von 17-OH-Prog. bei Kollektiv (1) und Kollektiv (2) durch den U-Test von WILCOXON, Mann und Whitney:

Rangzahl	Meßwert	Kollektiv	Rangzahl	Meßwert	Kollektiv
1	41	m	24	219	n
2	45	m	25	267	n
3	76	m	26	280	n
4	83	m	27	291	n
5	127	m	28	292	n
6	146	m	29	297	m
7	148	m	30	343	n
8	149	n	31	389	n
9	150	m	32	418	n
10	16	m	33	427	n
11	162	m	34	442	n
12	168	m	35	498	n
13	168	m	36	506	n
14	175	n	37	560	n
15	184	m	38	570	n
16	191	m	39	636	n
17	196	n	40	639	n
18	208	m	41	649	n
19	210	m	42	670	n
20	215	n	43	702	n
21	215	n	44	715	n
22	217	n	45	985	n
23	218	n	46	1154	n

$R_1 = 180$ (= Summe der auf Stichprobe 1 entfallenden Rangzahlen)

$R_2 = 948$ (= Summe der auf Stichprobe 2 entfallenden Rangzahlen)

$m = 17, n = 30$ (m = Anzahl der Stichprobenwerte aus Stichprobe 1)
(n = Anzahl der Stichprobenwerte aus Stichprobe 2)

$mn = 510$

$U_1 = 483$

$U_2 = 27$

Kontrolle : $U_1 + U_2 = mn$ ($483 + 27 = 510$) stimmt

Prüfgröße $U = 27$;

Kritischer Wert von U für den zweiseitigen Test bei $\alpha = 0,002$: $U = 118$;

Ergebnis:

Da das errechnete U kleiner ist, als der kritische Wert von U , können wir die Nullhypothese gleicher Mittelwerte auf dem 0,2%-Signifikanzniveau verwerfen.

Vergleich der Anstiege von 17-OH-Prog. der beiden Versuchskollektive
mit dem t-Test nach Student:

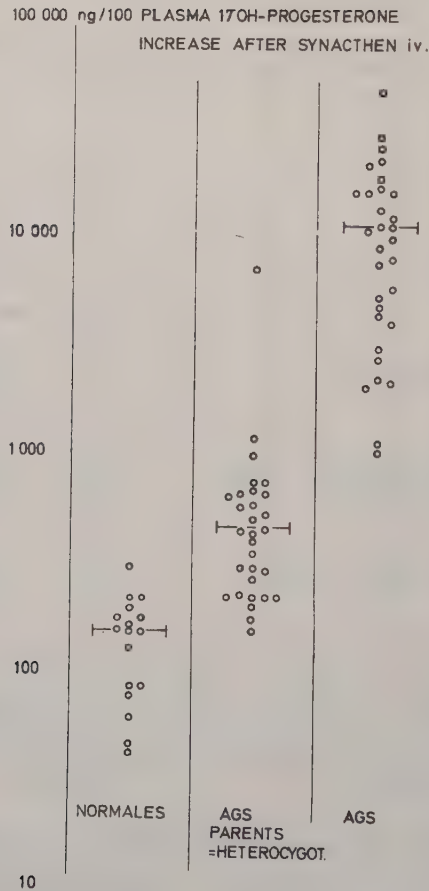
Berechnung: DIEHL algotronic, Progr. No. 40 513
VP 43 nicht berücksichtigt.

Anzahl Werte im Kollektiv:	$n_1 = 17$ $n_2 = 29$
arithmetische Mittel der Werte:	$\bar{x}_1 = 150,88$ $\bar{x}_2 = 449,55$
Standardabweichung der Werte:	$s_1 = 64,09$ $s_2 = 249,13$
Standardabweichung der arithm. Mittel ("mean error of the mean"):	$s(\bar{x}_1) = 15,54$ $s(\bar{x}_2) = 46,26$
Standardabweichung beider Kollektive:	$s_{x_1+x_2} = 202,46$
Streuung der Differenz der arithm. Mittel:	$r = 61,85$
t-Wert nach Student:	<u>$t = 4,8287$</u>
Anzahl der Freiheitsgrade:	$n_1 + n_2 - 2 = 44$
t-Wert (Schwellenwert) bei zweiseitiger Verteilung mit 44 Freiheits- graden und $2 P = 0,001$:	<u>$t = 3,5264$</u>

Ergebnis:

Da das errechnete t größer ist, als das angegebene Schwellenwert - t,
können wir die Nullhypothese auf dem 0,1%-Signifikanzniveau verwerfen.
Graphische Darstellung siehe Abbildung 3, Seite 30.

Abbildung 3:



Der Anstieg der Plasmakonzentration von 17- α -Hydroxyprogesteron innerhalb einer Stunde nach intravenöser ACTH-Belastung bei Normalpersonen, heterozygoten und homozygoten Merkmalsträgern eines adrenogenitalen Syndroms (Ordinate logarithmisch geteilt).

Wertung der Daten:

- (1) Der kleinste Basalwert beträgt bei den Normalpersonen 37 ng/100 ml, bei den Heterozygoten 26 ng/100 ml 17-OH-Prog. im Plasma.
- (2) Der größte Basalwert beträgt bei den Normalpersonen 236 ng/100 ml, bei den Heterozygoten 371 ng/100 ml 17-OH-Prog. im Plasma.
- (3) Der kleinste Wert nach ACTH-Stimulation beträgt bei den Normalpersonen 82 ng/100 ml, bei den Heterozygoten 246 ng/100 ml 17-OH-Prog. im Plasma.
- (4) Der größte Wert nach ACTH-Stimulation beträgt bei den Normalpersonen 456 ng/100 ml, bei den Heterozygoten 1180 ng/100 ml 17-OH-Prog. im Plasma.
- (5) VP 43 fällt mit einem AGS-typischen Wertepaar völlig aus dem Heterozygotenkollektiv. Der Befund bedarf näherer Abklärung.
- (6) Der kleinste gemessene Anstieg an 17-OH-Prog. beträgt bei den Normalpersonen 41 ng/100 ml, bei den Heterozygoten 149 ng/100 ml.
- (7) Der größte gemessene Anstieg an 17-OH-Prog. beträgt bei den Normalpersonen 297 ng/100 ml, bei den Heterozygoten 1154 ng/100 ml.
- (8) Die Heterozygoten steigen, ausgehend von einem durchschnittlich etwas niedrigeren Basalwert, nach ACTH-Stimulation auf etwa doppelt so hohe Werte an als die Normalpersonen.
- (9) Der durchschnittliche Anstieg an 17-OH-Prog.i.Pl. beträgt dementsprechend 150 ng/100 ml bei den Normalpersonen und 449 ng/100 ml bei den Heterozygoten.
- (10) Die Mittelwerte der beiden Kollektive von Versuchspersonen sind auf dem 0,1%-Signifikanzniveau different.
- (11) Von den 30 untersuchten Heterozygoten können aufgrund des Anstieges an 17-OH-Prog. 18 als heterozygot erkannt werden.

Ergebnis der Untersuchungen:

Normalpersonen, d.h. mutmaßlich genetisch unbelastete Personen und heterozygote Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms unterscheiden sich signifikant in der Höhe des Anstieges von 17-OH-Prog.im Plasma nach intravenöser ACTH-Stimulation (Signifikanzniveau 0,1 %).

In den verwendeten Versuchskollektiven lassen sich dadurch 18 von 30 untersuchten AGS-Eltern als heterozygot erkennen. Dieser Test erfaßt also 60 % der Heterozygoten.

3.2.0 Das Verhalten der Plasmakonzentration von 17-alpha-Hydroxyprogesteron unter intravenöser ACTH-Belastung bei Kindern mit adrenogenitalem Syndrom

Die Meßwerte:

KOLLEKTIV (3) a: AGS-KINDER, C21-Hydroxylase-Insuffizienz, substituiert				
VP No.	Geschlecht	17-OH-Prog.i.Pl. vor Synacthen (ng/100 ml)	17-OH-Prog.i.Pl. nach Synacthen (ng/100 ml)	Anstieg 17-OH-Prog. (ng/100 ml)
48	w	20183	37000	16817
49	w	5000	50800	45800
50	m	524	9175	8651
51	w	14100	17000	2900
52	w	1987	5820	3833
53	w	846	16650	15804
54	w	870	13800	12930
55	m	220	8650	8430
56	w	10900	44800	33900
57	w	4730	14400	9670
58	m	56	314	258
59	w	14100	27400	13300
60	m	8800	24250	15450
61	m	10450	32800	22350
62	w	94	4840	4746
63	w	6120	9000	2880
64	w	67	1190	1123
65	w	1270	8820	7550
66	w	96	2300	2204
67	w	1890	22900	21010
68	w	3962	7615	3653
69	w	26900	31100	4200
70	w	207	4590	4383
71	m	648	11900	11252
72	m	19600	30200	10600
73	m	875	9890	9015
74	w	15240	25700	10460
75	w	2580	18100	15520
76	w	9250	20400	11150
77	w	3760	4730	970
Mittelwert		6177	17204	11026
kleinster Wert		56 (VP 58)	314 (VP 58)	258 (VP 58)
größter Wert		26900 (VP 69)	50800 (VP 49)	45800 (VP 49)
Standardabweichung		7250	13112	9927
Variationskoeffizient		117,3 %	76,2 %	90,0 %

VP 58, gekennzeichnet durch seine niedrigen Werte, ist mit Corticosteroiden vollsubstituiert. Das AGS ist aus dem 17-OH-Prog.i.Pl. nicht mehr erkennbar.

Vergleich der Anstiege der Plasmakonzentration von 17-OH-Prog. unter ACTH-Belastung bei Kindern mit adrenogenitalem Syndrom (n_3) und Normalpersonen (n_1) bzw. Heterozygoten (n_2) mit dem

t-Test nach Student

Berechnung: DIEHL algotronic, Progr. No. 40513

VP 43 nicht berücksichtigt

	Koll. 1/Koll.3	Koll.2/Koll.3
Anzahl Werte im Kollektiv:	$n_1 = 17$ $n_3 = 30$	$n_2 = 29$ $n_3 = 30$
arithmetische Mittel der Werte:	$\bar{x}_1 = 150,8$ $\bar{x}_3 = 11026,9$	$\bar{x}_2 = 449,5$ $\bar{x}_3 = 11026,9$
Standardabweichung der Werte:	$s_1 = 64,09$ $s_3 = 9927,02$	$s_2 = 249,13$ $s_3 = 9927,02$
Standardabweichung der arithm. Mittel ("mean error of the mean"):	$s(\bar{x}_1) = 15,54$ $s(\bar{x}_3) = 1812,4$	$s(\bar{x}_2) = 46,26$ $s(\bar{x}_3) = 1812,4$
Standardabweichung beider Kollektive:	$s_{x_1+x_3} = 7969,2$	$s_{x_2+x_3} = 7082,9$
Streuung der Differenz der arithm. Mittel:	$r = 2418,6$	$r = 1844,3$
t-Wert nach Student:	<u>$t = 4,4967$</u>	<u>$t = 5,7349$</u>
Anzahl der Freiheitsgrade:	$n_1+n_3-2 = 45$	$n_2+n_3-2 = 57$
Student-t-Schwellenwert bei zweiseitiger Verteilung und $2 P = 0,001$:	<u>$t = 3,5207$</u>	<u>$t = 3,4702$</u>

Ergebnis:

Da das errechnete t in beiden Fällen größer ist, als das angegebene Schwellenwert- t , können wir die Nullhypothese jeweils auf dem 0,1%-Signifikanzniveau verwerfen.

KOLLEKTIV (3) b: AGS-KINDER, C11-Hydroxylase-Insuffizienz, substituiert				
VP. No.	Geschlecht	17-OH-Prog.i.Pl. vor Synacthen (ng/100 ml)	17-OH-Prog.i.Pl. nach Synacthen (ng/100 ml)	Anstieg 17-OH-Prog. (ng/100 ml)
78	w	344	567	223
79	w	41	143	102

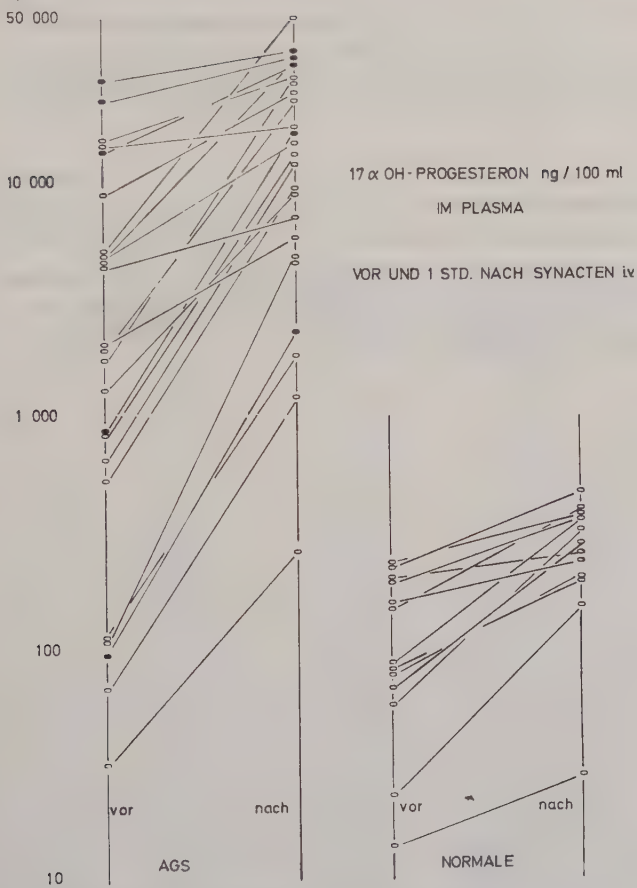
KOLLEKTIV (3) c: AGS-KINDER, unbehandelt				
VP. No.	Geschlecht	17-OH-Prog.i.Pl. vor Synacthen (ng/100 ml)	17-OH-Prog.i.Pl. nach Synacthen (ng/100 ml)	Anstieg 17-OH-Prog. (ng/100 ml)
80	w	40413	58000	17587
81	w	1093	17900	16807
82	m	11900	19300	7400

Graphische Darstellung siehe Abbildung 3 und 4, Seite 30 und 35.

Wertung der Daten

- (1) Der kleinste Basalwert beträgt bei den Kindern mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz 56 ng/100 ml, der größte Basalwert beträgt 26900 ng/100 ml 17-OH-Prog.i.Pl.
- (2) Der kleinste Wert nach ACTH-Stimulation beträgt als Folge der NNR-Suppression bei Substitution mit hohen Dosen von Corticosteroiden bei den Kindern mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz 314 ng/100 ml, der größte Wert beträgt 50800 ng/100 ml 17-OH-Prog.i.Pl.
- (3) Der kleinste Anstieg an 17-OH-Prog.i.Pl. beträgt bei den Kindern mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz 258 ng/100 ml, der größte Anstieg beträgt 45800 ng/100 ml.
- (4) Der mittlere Anstieg an 17-OH-Prog.i.Pl. beträgt bei den Kindern mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz 11026 ng/100 ml.
- (5) Die Kinder mit C11-Hydroxylase-Insuffizienz weisen gegenüber den Kindern mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz sehr viel kleinere Werte auf. Der mittlere Anstieg an 17-OH-Prog.i.Pl. beträgt bei diesem Kollektiv nur 162 ng/100 ml.
- (6) Die Kinder mit unbehandeltem adrenogenitalen Syndrom weisen dagegen sehr hohe Werte auf. Der mittlere Anstieg an 17-OH-Prog.i.Pl. beträgt bei diesem Kollektiv 13931 ng/100 ml.
- (7) Der Mittelwert des Kollektives der AGS-Kinder mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz ist auf dem 0,1%-Signifikanzniveau different von den Mittelwerten sowohl des Normalkollektives als auch des Kollektives der heterozygoten Merkmalsträger.

Abbildung 4:



Der Anstieg der Plasmakonzentration von 17-alpha-Hydroxyprogesteron innerhalb einer Stunde nach intravenöser ACTH-
Belastung bei Normalpersonen und Kindern mit adrenogeni-
talem Syndrom (Ordinate logarithmisch geteilt).

- : unkompliziertes AGS
- : AGS mit Salzverlust

Ergebnis der Untersuchungen

Homozygote Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms unterscheiden sich signifikant von heterozygoten Merkmalsträgern und Normalpersonen im Anstieg an 17-OH-Prog.i.Pl. unter intravenöser ACTH-Belastung (Signifikanzniveau 0,1 %).

Die Kinder mit substituierter C21-Hydroxylase-Insuffizienz zeigen einen hohen Anstieg von durchschnittlich 11026 ng/100 ml. Die Kinder mit unbehandeltem AGS zeigen einen noch höheren Anstieg von durchschnittlich 13900 ng/100 ml. Die Kinder mit C11-Hydroxylase-Insuffizienz jedoch liegen mit einem mittleren Anstieg von 162 ng/100 ml im Bereich des Normalkollektivs.

3.3.0 Das Verhalten der Plasmakonzentration von Cortisol unter intra-
venöser ACTH-Belastung bei Normalpersonen und heterozygoten
Merkmalsträgern eines adrenogenitalen Syndroms

Das Verhältnis der Anstiege der Plasmakonzentrationen von 17-alpha-
Hydroxyprogesteron und Cortisol unter intravenöser ACTH-Belastung

Die Meßwerte:

KOLLEKTIV (1): NORMALPERSONEN					
VP.No.	Geschl.	Cortisol i.Pl. vor Synacthen (ug/100 ml)	Cortisol i.Pl. nach Synacthen (ug/100 ml)	Anstieg Cortisol (ug/100 ml)	Anstieg 17-OH-Pr. Anstieg Cortisol
1	m	11,8	39,8	28,0	$6,8 \cdot 10^{-3}$
2	m	18,8	30,6	11,8	6,4 "
3	m	16,4	34,2	17,8	9,1 "
4	m	17,3	29,9	12,6	10,0 "
5	m	14,2	40,6	26,4	6,3 "
6	m	17,4	42,8	25,4	8,2 "
7	m	17,3	47,9	30,6	2,7 "
8	m	28,0	53,6	25,6	11,5 "
9	m	28,4	53,1	24,7	6,0 "
10	m	15,7	48,5	32,8	4,4 "
11	m	17,3	47,5	30,2	1,4 "
12	m	21,2	48,4	27,2	6,2 "
13	m	24,1	58,3	34,2	1,2 "
14	w	24,6	75,0	50,4	2,9 "
15	m	25,1	64,8	39,7	5,2 "
16	m	10,8	33,0	22,2	8,3 "
17	w	23,3	40,0	16,7	9,6 "
Mittelwert		19,5	26,3	26,8	6,24 "
kleinster Wert		10,8	29,9	11,8	1,2 "
größter Wert		28,4	75,0	50,4	11,5 "
Standardabweichung		5,32	12,21	9,61	3,02 "
Variationskoeffizient		27,29 %	26,35 %	35,83 %	48,47 %

KOLLEKTIV (2):		AGS-ELTERN			
VP No.	Geschl.	Cortisol i.Pl. vor Synacthen (ug/100 ml)	Cortisol i.Pl. nach Synacthen (ug/100 ml)	Anstieg Cortisol (ug/100 ml)	Anstieg 17-OH-Pr. Anstieg Cortisol
18	w	16,2	34,7	18,5	$14,4 \cdot 10^{-3}$
19	w	21,0	54,4	33,4	10,2 "
20	m	13,2	40,0	26,8	18,6 "
21	w	18,5	41,6	23,1	9,3 "
22	w	35,9	62,6	26,7	8,2 "
23	w	1,5	24,9	23,4	8,4 "
24	w	20,2	41,0	20,8	10,5 "
25	m	19,6	44,6	25,0	15,5 "
26	m	17,0	37,1	20,1	25,1 "
27	w	15,8	33,0	17,2	38,9 "
28	m	18,2	40,8	22,6	31,6 "
29	w	14,9	38,3	23,4	12,5 "
30	m	9,5	32,2	22,7	18,4 "
31	m	16,7	34,3	17,6	36,9 "
32	w	11,7	42,2	30,5	23,0 "
33	m	24,7	41,4	16,7	12,9 "
34	w	34,4	54,4	20,0	22,1 "
35	m	18,2	31,1	12,9	21,7 "
36	w	29,8	59,4	29,6	14,4 "
37	w	39,7	69,7	30,0	38,4 "
38	m	20,8	41,0	20,2	28,2 "
39	w	45,7	58,5	12,8	16,9 "
40	m	8,6	34,3	25,7	24,8 "
41	m	32,4	49,1	16,7	33,5 "
42	w	11,0	42,1	31,1	4,8 "
43	m	17,1	31,7	14,6	476,4 "
44	m	24,7	49,2	23,5	12,4 "
45	m	19,7	88,6	68,9	9,2 "
46	w	31,1	68,4	37,3	4,7 "
47	w	13,4	62,3	48,9	20,2 "
Mittelwert		20,7	46,0	25,3	34,0 "
kleinster Wert		1,5	24,9	12,8	4,7 "
größter Wert		45,7	88,6	68,9	476,4 "
Standardabweichung		9,89	14,22	11,21	84,12 "
Variationskoeffizient		47,7 %	30,86 %	44,22 %	246,90 %
ohne Berücksichtigung von VP 43:					
Mittelwert					$18,8 \cdot 10^{-3}$
größter Wert					38,9 "
Standardabweichung					10,01 "
Variationskoeffizient					53,21 %

VP 43 ist verdächtig auf ein adrenogenitales Syndrom (siehe 3.1.1).

Vergleich der Verhältnisse der Anstiege der Plasmakonzentrationen von 17-OH-Prog. und Cortisol unter ACTH-Belastung mit dem

t - Test nach Student:

Berechnung: DIEHL algotronic, Progr. No. 40513

VP 43 nicht berücksichtigt.

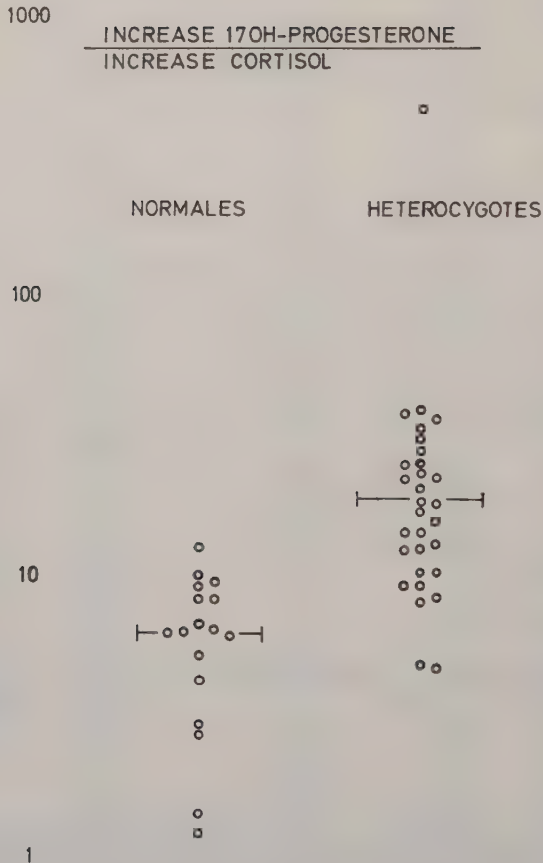
Anzahl Werte im Kollektiv:	$n_1 = 17$
	$n_2 = 29$
arithmetische Mittel der Werte:	$\bar{x}_1 = 6,24$
	$\bar{x}_2 = 18,81$
Standardabweichung der Werte:	$s_1 = 3,02$
	$s_2 = 10,01$
Standardabweichung der arithm. Mittel:	$s(\bar{x}_1) = 0,7345$
	$s(\bar{x}_2) = 1,8596$
Standardabweichung beider Kollektive:	$s_{x_1+x_2} = 8,1949$
Streuung der Differenz der arithm. Mittel:	$r = 2,5035$
t-Wert nach Student:	<u>$t = 5,0210$</u>
Anzahl der Freiheitsgrade:	$n_1+n_2-2 = 44$
Student-t-Schwellenwert bei zweiseitiger Verteilung mit 44 Freiheitsgraden und $2 P = 0,001$:	<u>$t = 3,5264$</u>

Ergebnis:

Da das errechnete t größer ist, als der angegebene Schwellenwert von t, können wir die Nullhypothese auf dem 0,1%-Signifikanzniveau verwerfen.

Graphische Darstellung siehe Abbildung 5, Seite 40.

Abbildung 5:



Das Verhältnis der Anstiege der Plasmakonzentrationen von 17-alpha-Hydroxyprogesteron (in ng/100 ml) und Cortisol (in ug/100 ml) innerhalb einer Stunde nach intravenöser ACTH-Belastung bei Normalpersonen und heterozygoten Merkmalsträgern eines adrenogenitalen Syndroms (Ordinate logarithmisch geteilt).

Wertung der Daten:

- (1) Der kleinste Basalwert beträgt bei den Normalpersonen 10,8 ug/100 ml, bei den Heterozygoten 1,5 ug/100 ml Cortisol i.Pl.
- (2) Der größte Basalwert beträgt bei den Normalpersonen 28,4 ug/100 ml, bei den Heterozygoten 45,7 ug/100 ml Cortisol i.Pl.
- (3) Der kleinste Wert nach ACTH-Stimulation beträgt bei den Normalpersonen 29,9 ug/100 ml, bei den Heterozygoten 24,9 ug/100 ml Cortisol i.Pl.
- (4) Der größte Wert nach ACTH-Stimulation beträgt bei den Normalpersonen 75,0 ug/100 ml, bei den Heterozygoten 88,6 ug/100 ml Cortisol i.Pl.
- (5) Der kleinste gemessene Anstieg an Cortisol i.Pl. ist bei den Normalpersonen 11,8 ug/100 ml, bei den Heterozygoten 12,8 ug/100 ml.
- (6) Der größte gemessene Anstieg an Cortisol i.Pl. ist bei den Normalpersonen 50,4 ug/100 ml. bei den Heterozygoten 68,9 ug/100 ml.
- (7) Die Normalpersonen steigen, ausgehend von einem etwas niedrigeren Basalwert, im Durchschnitt auf etwa genauso hohe Werte nach ACTH-Stimulation an als die Heterozygoten.
- (8) Der durchschnittliche Anstieg an Cortisol i.Pl. ist dementsprechend mit 26,8 ug/100 ml bei den Normalpersonen etwas größer als bei den Heterozygoten mit 25,3 ug/100 ml.
- (9) Das Verhältnis der Anstiege von 17-OH-Prog. i.Pl. zu Cortisol i.Pl. beträgt im Durchschnitt bei den Normalpersonen $6,24 \cdot 10^{-3}$, bei den Heterozygoten $34,0 \cdot 10^{-3}$ bzw. $18,8 \cdot 10^{-3}$ ohne VP 43.
- (10) Die Mittelwerte dieses Verhältnisses bei den beiden Versuchskollektiven sind auf dem 0,1%-Signifikanzniveau different.
- (11) Von den 30 untersuchten AGS-Eltern können anhand dieses Quotienten 22 als heterozygot erkannt werden.

Ergebnis der Untersuchungen:

Normalpersonen, d.h. mutmaßlich genetisch unbelastete Personen, und heterozygote Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms unterscheiden sich signifikant in der Größe des Verhältnisses des Anstieges von 17-OH-Prog. i.Pl. zum Anstieg von Cortisol i.Pl. unter intra-venöser ACTH-Belastung (Signifikanzniveau 0,1 %).

In den verwendeten Versuchskollektiven lassen sich durch Ermittlung dieses "AGS-Steroid-Quotienten" (i.F. ASQ) 22 von 30 untersuchten AGS-Eltern als heterozygot erkennen.

Durch Einbeziehung des Cortisols steigert sich die Schärfe des Heterozygotentests also auf 74 %.

3.4.0 Das Verhalten der Plasmakonzentration von Cortisol unter intra-venöser ACTH-Belastung bei Kindern mit adrenogenitalem Syndrom

Die Meßwerte:

KOLLEKTIV (3) a: AGS-KINDER, C21-Hydroxylase-Insuffizienz, substituiert				
VP No.	Geschlecht	Cortisol i.Pl. vor Synacthen (ug/100 ml)	Cortisol i.Pl. nach Synacthen (ug/100 ml)	Anstieg Cortisol (ug/100 ml)
48	w	7,1	5,9	---
49	w	4,0	6,4	2,4
50	m	7,0	5,3	---
51	w	10,4	6,5	---
52	w	5,1	4,1	---
53	w	3,7	6,7	3,0
54	w	10,0	9,4	---
55	m	3,0	1,1	---
56	w	5,3	5,1	---
57	w	24,3	25,2	0,9
58	m	11,1	30,9	19,8
59	w	2,4	3,2	0,8
60	m	2,3	4,1	1,8
61	m	4,7	4,6	---
62	w	9,0	5,0	---
63	w	5,5	3,5	---
64	w	46,2	50,0	3,8
65	w	12,5	20,5	8,0
66	w	25,3	15,1	---
67	w	9,8	8,0	---
68	w	2,2	3,5	1,3
69	w	2,5	3,1	0,6
70	w	5,4	13,0	7,6
71	m	13,4	11,8	---
72	m	7,3	8,9	1,6
73	m	4,5	1,9	---
74	w	11,5	12,2	0,7
75	w	15,5	11,9	---
76	w	14,6	10,2	---
77	w	34,0	15,5	---
Mittelwert		10,6	10,4	4,0 (n=13)
kleinster Wert		2,2	1,1	0,6
größter Wert		46,2	50,0	19,8
Standardabweichung		10,0	10,1	5,3
Variationskoeffizient		94,1 %	97,6 %	132,7 %

Bei 17 von 30 Versuchspersonen aus diesem Kollektiv kommt es unter ACTH-Belastung zu einem Abfall des Cortisolspiegels im Plasma.

KOLLEKTIV (3) b: AGS-KINDER, C11-Hydroxylase-Insuffizienz, substituiert				
VP No.	Geschlecht	Cortisol i.Pl. vor Synacthen (ng/100 ml)	Cortisol i.Pl. nach Synacthen (ng/100 ml)	Anstieg Cortisol (ng/100 ml)
78	w	39,4	20,1	---
79	w	11,3	6,2	---

KOLLEKTIV (3) c: AGS-KINDER, unbehandelt				
VP No.	Geschlecht	Cortisol i.Pl. vor Synacthen (ng/100 ml)	Cortisol i.Pl. nach Synacthen (ng/100 ml)	Anstieg Cortisol (ng/100 ml)
80	w	11,2	12,5	1,3
81	w	29,7	20,1	---
82	m	16,5	24,0	7,5

Wertung der Daten:

- (1) 57 % aller untersuchten Kinder mit adrenogenitalem Syndrom reagieren paradox auf intravenöse ACTH-Gabe, d.h. es kommt bei ihnen während einer Stunde zu einem Abfall des Plasmaspiegels an Cortisol.
- (2) Die übrigen Kinder zeigen nur einen geringen Anstieg des Cortisolspiegels im Plasma unter ACTH-Belastung.
- (3) Bei den Kindern mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz beträgt dieser Anstieg durchschnittlich 4 ug/100 ml.
- (4) Der Basalwert liegt mit durchschnittlich 10,5 ug/100 ml Cortisol bei den Kindern mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz deutlich tiefer als bei den heterozygoten Merkmalsträgern und den Normalpersonen.
- (5) Alle untersuchten Kinder mit C11-Hydroxylase-Insuffizienz reagieren im oben beschriebenen Sinne paradox auf ACTH-Gabe.
- (6) Die paradoxe Reaktion auf ACTH-Gabe ist nicht geschlechtsspezifisch.
- (7) Der Cortisol-Abfall, wie er unter ACTH-Belastung bei Kindern mit adrenogenitalem Syndrom beobachtet wurde, ist ein Phänomen, das sich nicht befriedigend erklären läßt. Folgende Mechanismen scheinen jedoch von Bedeutung zu sein:

- a) Die Cortisolsynthese bildet mit der Gesamtheit der Abbau- und Metabolisierungsvorgänge ein Fließgleichgewicht, für dessen jeweilige Lage der Plasmaspiegel an Cortisol einen groben Anhalt gibt. Der Stärkegrad, in dem die Enzyminszuffizienz ausgeprägt ist, entscheidet darüber, welche Lage dieses Fließgleichgewicht einnimmt.
- Bei geringer Enzyminszuffizienz kann die Synthese den Gesamtabbau noch übertreffen: es resultiert eine Erhöhung des Cortisol-Plasmaspiegels (VP 49, 53 u.a.).
 - Bei einem gewissen Grad der Enzyminszuffizienz sind Auf- und Abbau gleich: der Plasmaspiegel bleibt konstant (VP 61).
 - Bei stärkerer Enzyminszuffizienz schließlich hält die Synthese mit dem Gesamtabbau nicht mehr Schritt: es resultiert ein allmählicher Abfall des Cortisol-Plasmaspiegels (VP 48, 50 u.a.).
- b) Nach allen Kenntnissen handelt es sich bei dem Regelkreis CRF-ACTH-Cortisol nicht um ein einfaches "negatives Rückkopplungssystem", sondern um eine in relativ selbständigen Stufen aufgebaute und zentral zusammengefaßte Regulation (HENI (24). Veränderungen eines Regelwertes lassen also nicht ohne weiteres auf eine entsprechende Reaktion anderer Regelgrößen schließen.
- c) Beim unbehandelten AGS versucht der Organismus, durch maximale ACTH-Ausschüttung und die dadurch erreichbare Hyperplasie der Nebennierenrinde die Erhaltung eines lebensnotwendigen Basalspiegels an Cortisol im Plasma zu erzwingen. Eine weitere Steigerung der Cortisolsynthese durch zusätzlich exogen zugeführtes ACTH, etwa beim Synacthen-Test, ist der NNR nur in geringem Umfang oder gar nicht möglich.
- d) Die Substitutionsbehandlung mit Corticosteroiden beim AGS führt hingegen zu einer dosisabhängigen Suppression der Nebennierenrinde.
- e) Das 17-alpha-Hydroxyprogesteron vermag durch kompetitive Hemmung die 11-, 17-alpha- und 21-Hydroxylase zu blockieren. Dieser Mechanismus fällt beim AGS vom C21-Typ stark ins Gewicht, da
- das 17-alpha-Hydroxyprogesteron bei diesem Syndrom gewaltig angestaut und
 - das 21-Hydroxylasesystem bereits insuffizient ist.

- f) Der Cortisolabbau, der durch mehrere Hydrogenierungsvorgänge an mikrosomalen Enzymen des endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle unter Mitwirkung von Cytochrom P 450 als Sauerstoffdonator eingeleitet wird, ist durch Enzyminduktion stark aktivierbar (REMMER (23)). Das Cytochrom-P-450-System hängt in seiner Aktivität unter anderem von Alter, Geschlecht, Ernährungs- und NADPH-Angebot ab und variiert auffallend stark von Individuum zu Individuum. Es ist einerseits durch zahlreiche Substrate induzierbar, andererseits können Substrate mit hoher Affinität die Bindungsstellen besetzen und die Oxydation anderer Substrate hemmen (REMMER (23)).
- Somit ist auch der Abbau des Cortisol eine von vielen Faktoren beeinflussbare und sehr veränderliche Größe.
- g) Möglicherweise verdrängt 17-alpha-Hydroxyprogesteron das Cortisol aus seiner Eiweißbindung an Transcortin (CBG). Das freiwerdende Cortisol wird schnell metabolisiert und verläßt die Blutbahn.

Das Zusammenwirken vieler Einzelmechanismen und das Ineinandergreifen komplizierter Steuerungsvorgänge auf dem Boden individueller Funktionszustände entscheiden letztlich über Richtung und Größe der Änderung des Cortisolspiegels i.Pl. unter ACTH-Belastung.

Ergebnis der Untersuchungen:

Homozygote Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms reagieren im Gegensatz zu heterozygoten Merkmalsträgern und Normalpersonen zu über 50 % paradox auf intravenöse ACTH-Belastung. Dies wird im Abfallen des Cortisol-Plasmaspiegels während der einstündigen Stimulation sichtbar. Die restlichen Homozygoten zeigen, ausgehend von durchschnittlich sehr niedrigen Basalwerten, nur einen geringfügigen Anstieg des Cortisols im Plasma.

Die paradoxe Reaktion auf ACTH-Gabe ist nicht geschlechtsgebunden.

3.5.0 Zusammenfassende schematische Darstellung des Anstieges von 17-OH-Progesteron i.Pl., von Cortisol i.Pl. und des ASQ unter intravenöser ACTH-Belastung bei den untersuchten Kollektiven

Abbildung 6:

	Anstieg 17-OH-Prog.i.Pl.	Anstieg Cortisol i.Pl.	ASQ
Normalpersonen	↔	↔	↔
Heterozygote	↑	↓	↑
Homozygote C21, unter Behandl.	↑ ↑	↓↓ oder Abfall	↑↑ oder ∅
Homozygote C11	↔	Abfall	∅
Homozygote C21, unbehandelt	↑ ↑ ↑	↓ oder Abfall	↑↑ oder ∅

Zeichenerklärung:



normal



größer als normal



kleiner als normal



ASQ negativ (wegen Cortisol-Abfall)

Abfall

Abfall der Plasmakonzentration von Cortisol unter ACTH-Stimulierung der NNR innerhalb einer Stunde ("paradoxe Reaktion").

4.0 Besprechung der Ergebnisse

Heterozygotentest für das adrenogenitale Syndrom

Von der Versuchsperson werden zwei Blutproben gewonnen, und zwar die eine v o r , die andere 60 Minuten n a c h intravenöser Gabe von 0, 25 mg Synacthen.

In beiden Proben werden die Plasmakonzentrationen von 17-alpha-Hydroxyprogesteron und Cortisol bestimmt.

Aus den Meßwerten wird der "AGS-Steroid-Quotient" (ASQ) errechnet. Dieser ist das Verhältnis des Anstiegs von 17-OH-Prog.i.Pl. zum Anstieg von Cortisol i.Pl. unter ACTH-Belastung.

Ist der errechnete ASQ größer als $11,5 \cdot 10^{-3}$, so ist die Versuchsperson heterozygoter Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms.

Mit dem hier angegebenen Test lassen sich 74 % der Heterozygoten bestimmen. Eine weitere Steigerung der Treffsicherheit dieses Heterozygotentests ist durch einheitliche Blutentnahme bei allen Versuchspersonen zur selben Tageszeit zu erwarten. Der Fehler, der durch die beträchtliche tageszeitliche Schwankung der Plasmaspiegel der NNR-Hormone entsteht, würde dadurch vermieden. Aus organisatorischen Gründen war uns eine einheitliche Blutentnahme nicht möglich. Lediglich beim Normalkollektiv, zu dem sich die Ärzteschaft unserer Klinik zur Verfügung stellte, gelang es, die ACTH-Belastung einheitlich zwischen 11 und 12 Uhr mittags durchzuführen.

Der genetischen Beratung beim adrenogenitalen Syndrom, der häufigsten Erkrankung der Nebennierenrinde im Kindesalter, ist somit der Weg bereitet.

Exemplarische Anwendung des Heterozygotentests zur genetischen Beratung zweier klinisch unauffälliger Kinder, die je ein Geschwister mit adrenogenitalem Syndrom haben

Versuchspersonen:

VP 83, m Bruder eines AGS-Kindes
VP 84, w Schwester eines AGS-Kindes

Meßwerte:

VP No.	17-OH-Prog. vor/nach ACTH (ng/100 ml)	Cortisol vor/nach ACTH (ug/100 ml)	Anstieg 17-OH-Pr.i.Pl. (ng/100 ml)	Anstieg Cortisol i.P. (ug/100 ml)
83	19/655	8,4/35,8	636	27,4
84	51/322	48,3/75,0	271	26,7

Auswertung:

Errechnung des ASQ: VP 83: $\underline{\underline{ASQ}} = \frac{636}{27,4} \cdot 10^{-3} = \underline{\underline{23,2}} \cdot 10^{-3};$

VP 84: $\underline{\underline{ASQ}} = \frac{271}{26,7} \cdot 10^{-3} = \underline{\underline{10,2}} \cdot 10^{-3};$

Der höchste ASQ im Normalkollektiv beträgt $11,5 \cdot 10^{-3}$ s.o.

Ergebnis:

VP 83 ist heterozygoter Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms.
Im Falle einer Ehe ist die Testung der Partnerin unbedingt angezeigt.

VP 84 ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht Genträger eines adrenogenitalen Syndroms.

5.0 Zusammenfassung

Die Häufigkeit des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms beträgt 1 : 5000 (PRADER, Zürich. KNORR, München). Die Heterozygotenhäufigkeit für dieses Syndrom liegt bei 1 : 37. Diese überraschend hohen Zahlen sowie die Tatsache, daß unter der heutigen Substitutionstherapie mit NNR-Hormonen die meisten Patienten fertil werden, unterstreichen die Dringlichkeit eines Heterozygotentests für das AGS. Der Heterozygotentest ist die Voraussetzung zur genetischen Beratung bei rezessiven Erbkrankheiten.

Untersucht wurde der Anstieg von 17-alpha-Hydroxyprogesteron i.Pl. und von Cortisol i.P. innerhalb einer Stunde nach intravenöser Gabe von ACTH (0,25 mg SYNACTHEN^R) und das Verhältnis der Anstiege von 17-alpha-Hydroxyprogesteron zu Cortisol i.Pl. unter ACTH-Belastung bei 17 Normalpersonen, 30 heterozygoten Merkmalsträgern eines AGS (AGS-Eltern) und 35 Kindern mit adrenogenitalem Syndrom. Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen der beiden untersuchten Steroide erfolgt mit speziellen radioimmunologischen Analyseverfahren. Die 17-OH-Prog.-Methode schließt eine Säulenchromatographie auf Sephadex LH 20 ein, die Cortisol-Methode erfordert eine Lösungsmittelverteilung mit Tetrachlorkohlenstoff : Wasser.

Der mittlere Anstieg an 17-OH-Prog. beträgt 151 ng/100 ml bei den Normalpersonen, 450 ng/100 ml bei den Heterozygoten und 11026 ng/100 ml bei den Kindern mit adrenogenitalem Syndrom. Die drei Mittelwerte sind statistisch auf dem 0,1%-Signifikanzniveau different. Von den 30 untersuchten Heterozygoten liegen 18 höher als der höchste Normalwert.

Auch die Mittelwerte des Verhältnisses der Anstiege von 17-OH-Prog. und Cortisol i.Pl. unter ACTH-Belastung ("AGS-Steroid-Quotient" = ASQ) sind auf dem 0,1%-Signifikanzniveau different. Von den 30 untersuchten Heterozygoten liegen 22 höher als der höchste Normalwert. Der größte ASQ im Normalkollektiv beträgt $11,5 \cdot 10^{-3}$.

Mit diesem Test sind wir in der Lage, 74 % der heterozygoten Merkmalsträger eines adrenogenitalen Syndroms mit C21-Hydroxylase-Insuffizienz zu erkennen.

6.0 Literaturverzeichnis

- (1) OREL, H.: Kleine Beiträge zur Vererbungswissenschaft
6. Mitteilung z. Konst. Lehre, Berlin 14, 573 (1929)
- (2) CHILDS, B.; GRUMBACH, M.M. and WYK, J.J. van:
Virilizing adrenal hyperplasia. A genetic and hormonal study.
J.clin. Invest. 35, 213 (1956)
- (3) BIRKE, G.; DICZFALUSY, E.; PLANTIN, L.-O.; ROBBE, H. and WESTMAN, A.:
Familial congenital hyperplasia of the adrenal cortex.
Acta endocrin., Kbh. 29, 55 (1958)
- (4a) PRADER, A.; ANDERS, G.J.P.A. und HABICH, H.:
Zur Genetik des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms.
Helv. Paed. Acta 17, 271 (1962)
- (4b) PRADER, A.: Die Häufigkeit des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms.
Helv. Paed. Acta 14, 426 (1958)
- (5) GLEISPACH, H.; BERGER, H.; GLATZL, J.; RÜSSLER, H. und TSCHAGER, E.:
Pregnantriolon-Ausscheidung nach ACTH-Stimulierung bei mutmaßlichen
heterozygoten Merkmalsträgern eines 21-Hydroxylasedefektes.
Pädiatric u. Pädologie 6, 287 (1971)
- (6) CLEVELAND, W.W.; NIKEZIE, M. and MIGEON, C.J.:
Response to an 11- β -hydroxylase-inhibitor (SU 4885) in males with
adrenal hyperplasia and in their parents.
J. clin. Endocr. Metab. 22, 281 (1962)
- (7) BERGADA, C.M.; RIVAROLA, A. and CULLEN, M.:
Response to Metopirone in parents of patients with congenital adrenal
hyperplasia.
Excerpta Med. (Amst.) Intern. Congress Series 99, 130 (1965)
- (8) KNORR, D. and BUTENANDT, O.:
Gas Liquid Chromatographic Investigations in Homozygote and Hetero-
zygote Persons with Congenital Adrenal Hyperplasia.
Mitteilung am 7. Meeting der European Society for Pediatric Endo-
crinology, Wien (1968)

- (9) BIDLINGMAIER, F. und KNORR, D.:
Immunologische Methoden der Steroidbestimmung
Beckman report 1/72, 11-14 (1974)
- (10) LANDON, J.:
Der Radioimmunoassay. Die gelben Hefte, Behringwerke 13, 30 (1973)
- (11) KNORR, D.; BIDLINGMAIER, F.; BUTENANDT, O.; SCHNAKENBURG, K.v.;
and WAGNER, W.:
A test for heterocycosity in congenital adrenal hyperplasia (CAH).
European Society for Paediatric Endocrinology, Paris (1974)
- (12) SCHNAKENBURG, K.v.; BIDLINGMAIER, F. and KNORR, D.:
Quick diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to
21-hydroxylase by radioimmunoassay for 17-alpha-hydroxyprogesterone.
Scand. Paed. Acta 63, 322 (1974)
- (13) PHAM-HUU-TRUNG, M.T.; Gourmelen, M. and GIRARD, F.:
The simultaneous assay of cortisol and 17-alpha-hydroxyprogesterone
in the plasma of patients with congenital adrenal hyperplasia.
Acta Endocrinologica 74, 316 (1973)
- (14) LOHMEYER, H.:
Pregnantriolon und adrenogenitales Syndrom.
Biblioth. Gynaecol. No. 53, Vol. 40
- (15) SINGER, B.:
Adrenal corticosteroids - physiological considerations.
British Medical Journal 1, 36 (1972)
- (16) BLUNCK, W.:
Das adrenogenitale Syndrom.
Dt. Ärzteblatt 43, 2779 (1972)
- (17) Hamilton, W. and BRUSH, M.G.:
Four clinical variants of congenital adrenal hyperplasia.
Arch. Dis. Childh. 39, 66 (1964)
- (18) RAITI, S. and NEWNS, G.H.:
Congenital adrenal hyperplasia.
Arch. Dis. Childh. 39, 324 (1964)

- (19) GRUMBACH, M.M. and WILKINS, L.:
The pathogenesis and treatment of virilizing adrenal hyperplasia.
Pediatrics 17, 418 (1956)
- (20) STROTT, C.A.; Yoshimi, T. and LIPSETT, M.B.:
Plasma progesterone and 17-Hydroxyprogesterone in normal men and
children with congenital adrenal hyperplasia.
J. Clin. Invest. 48, 930, (1969)
- (21) NEW, M.I.:
Congenital adrenal hyperplasia.
Ped. Clinics of North America 15, 395 (1968)
- (22) LEYENDECKER, G.; WARDLAW, S. and NOCKE, W.:
Gamma Globulin protection of radioimmunoassay and competitive
protein binding saturation analysis of steroids.
J. Clin. Endocrin. Metab. 34, 430 (1972)
- (23) REMMER, H.:
Pharmakokinetik, Theorie und klinische Bedeutung.
Knoll Jahrbuch, 15 (1975)
- (24) HENI, F.:
Endokrinium.
in BOCK: Pathophysiologie Bd. 2, 268 (1973)
- (25) KNORR, D.:
Ultrareine Glasgeräte durch Ausheizen bei 500⁰ C.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 9, 145 (1971)

Lebenslauf

29. Juni 1950	geboren in Hohenpeißenberg Vater: Josef Wagner Mutter: Irmgard Wagner, geb. König
1956	Volksschule auf dem Hohenpeißenberg
1960	Gymnasium Weilheim
1969	Abitur am math.-nat.-wiss. Zweig
1969	Beginn des medizinischen Studiums an der Universität München
1970	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
1972	Ärztliche Vorprüfung
1972	Aufnahme der wissenschaftlichen Arbeit im Hormonlabor der Kinderklinik der Universität München
1975	Ärztliche Staatsprüfung an der Universität München

